

**Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Lars E. French**

Verträglichkeitsaspekte von Titanzahnimplantaten

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Aurélie Pauly

aus Luxemburg

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. P. Thomas
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Michael Stimmelmayer
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. rer. hum. biol. B. Summer
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	15.04.2019

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	IMPLANTATE	1
1.1.1	GESCHICHTE UND ENTWICKLUNG	1
1.1.2	IMPLANTATVERLUSTE	2
1.1.3	PERIIMPLANTITIS	2
1.2	ALLERGIE UND UNVERTRÄGLICHKEITSREAKTION	4
1.2.1	DEFINITION DER ALLERGIE	4
1.2.2	METALLALLERGIE	5
1.2.3	UNVERTRÄGLICHKEITSREAKTION	6
2	FRAGESTELLUNG	9
3	MATERIAL UND METHODEN	10
3.1	PATIENTEN	10
3.2	VERSUCHSÜBERBLICK UND ZELLGRUPPEN	13
3.2.1	ISOLIERUNG DER ZELLEN	13
3.2.1.1	EINLEITUNG	13
3.2.1.2	DURCHFÜHRUNG	13
3.3	STIMULANTIEN	15
3.4	LÖSUNGEN FÜR DIE FACS-ANALYSE	16
3.5	GERÄTE	16
3.6	SONSTIGE VERBRAUCHSMATERIALIEN	17
3.7	DURCHFLUSSZYTOMETRIE	17
3.7.1	EINFÜHRUNG	17
3.7.2	ERSTELLEN DER STANDARDREIHE	20
3.7.3	ERSTELLEN DER PROBEN FÜR DIE DURCHFLUSSZYTOMETRIE	20
3.7.4	MESSUNG	21
3.7.5	STATISTIK	23
4	ERGEBNISSE	23
4.1	VERGLEICH TiO_2 -RUTIL-PARTIKEL MIT TiO_2 -ANATASE-PARTIKEL UND TITANPLÄTTCHEN	23
4.2	ZUSAMMENHANG ZWISCHEN GENOTYP UND KOMPLIKATIONEN	27
4.3	ZUSAMMENHANG ZWISCHEN GENOTYP UND IL-1BETA-PRODUKTION	30
4.4	EINFLUSS DER BAKTERIEN AUF DIE WERTE DER INTERLEUKINE	36
5	DISKUSSION	42
5.1	VERGLEICH TiO_2 -RUTIL-PARTIKEL MIT TiO_2 -ANATASE-PARTIKEL UND TITANPLÄTTCHEN	42
5.2	ZUSAMMENHANG ZWISCHEN GENOTYP, KOMPLIKATION UND IL-1BETA-PRODUKTION	47
5.3	EINFLUSS DER BAKTERIEN AUF DIE WERTE DER INTERLEUKINE	58
6	ZUSAMMENFASSUNG	65
7	ANHANG	66
7.1	VERGLEICH TiO_2 -RUTIL-PARTIKEL MIT TiO_2 -ANATASE-PARTIKEL UND TITANPLÄTTCHEN: T-TEST BEI UNABHÄNGIGEN STICHPROBEN	66
7.2	P-WERTE IM KRUSKAL-WALLIS-TEST	73

8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	76
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	78
10	TABELLENVERZEICHNIS	79
11	LITERATURVERZEICHNIS	80
12	DANKSAGUNG	89
13	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	90

1 Einleitung

1.1 Implantate

1.1.1 Geschichte und Entwicklung

Zahnimplantate haben sich in den letzten Jahrzehnten zu einem wichtigen therapeutischen Mittel in der Zahnmedizin entwickelt [1]. Schon sehr früh bestand der Wunsch nach einem voll funktionsfähigen Gebiss und einem ästhetischen Aussehen. Daher verwundert es nicht, dass 2000 Jahre alte Schädel, mit einer Art Zahnimplantat aus Kobalt-Chrom oder aus Elfenbein gefunden wurden [2]. Die ersten Implantationsversuche der Neuzeit waren in der Regel Sofortimplantate die man direkt in die Extraktionswunde einbrachte. Jourdan und Magiolo (1807) versenkten in eine leere Alveole ein konisches Goldrohr. 1886 bereitete Younger als erster eine künstliche Alveole zur Aufnahme eines Implantates auf und 1913 setzte Greenfield ein enossales Implantat aus Platin-Iridium ein. Ende der 30er-Jahre wurden dann nichtoxidierende Metalle wie Chrom, Kobalt und Molybdän in der Zahnimplantologie benutzt. Als Vater der modernen Implantologie bezeichnet man heute vielfach den Namen Formigni, der als erster eine Heliokolloidal-Schraube verwendete. Eine große Vielfalt an Implantatformen folgte, unter anderem die subperiostalen Implantate, die vor allem in den 50er- und 60er-Jahren sehr beliebt waren. Allerdings brachten diese von Müller erstmals beschriebenen Implantate nicht die gewünschten Erfolge. Auch die Blattimplantate von Linkow werden heutzutage abgelehnt aufgrund des häufigen Auftretens von entzündlichen Komplikationen entlang des Implantates. In den 70er-Jahren kam man daher wieder zu den enossalen Implantaten zurück. Leonhard Linkow und Per-Ingvar Branemark haben in den letzten 35 Jahren die Entwicklung der Implantate in der Zahnmedizin maßgeblich geprägt. Das Benutzen von Reintitan und dessen Vorteile, die Wichtigkeit des sterilen chirurgischen Vorgehens und der funktionslosen Einheilung sind vor allem von Branemark erkannt worden. Heutzutage unterscheidet man noch zwischen wurzelförmigen, zylindrischen, zylindrisch-schraubenförmigen, beschichteten oder unbeschichteten Implantaten. Zudem wird unterschieden zwischen Implantaten die trans- oder subgingival einheilen, und zwischen metallischen, aus Titan bestehenden Implantaten und Keramikimplantaten, die aus Zirkonoxidkeramik bestehen und einen ästhetischen Vorteil besitzen [3].

Vor allem die Titanimplantate mit den biochemisch äußerst stabilen Titanoxiden der Außenhaut gestatten die direkte Anlagerung von mineralisiertem Knochen. Es besteht somit eine direkte Verbindung zwischen dem organischen, lebenden Knochen und dem Implantat, welche man als Osseointegration bezeichnet. Diese ist von größter Bedeutung für das Überleben des Implantates. Durch zusätzliches Strahlen, anodisches Oxidieren und/oder Ätzen entsteht eine raue Struktur im Mikrometerbereich die die Anlagerung der Knochenzellen erlaubt. Hier ist allerdings abzuwägen inwieweit eine raue Oberfläche auch die Anlagerung von Bakterien begünstigt [4].

Um die Osseointegration zu erreichen, muss eine Primärstabilität garantiert werden. Diese wird durch Makrostrukturen in Form von Gewinden gewährleistet. Die

Sekundärstabilität bezieht sich dann auf die biologische knöcherne Verankerung des Implantates, die Osseointegration [3].

Die Erfolgsraten der Implantate liegen sehr hoch, zwischen 80-95%. Nur 2,5% der Implantate, die nicht unter Belastung einer Krone, Brücke oder einer Prothese stehen, gehen in den ersten 5-10 Jahren verloren. Zusätzlich gehen 0,5 bis 1,3% pro Jahr der unter Belastung stehenden Implantate verloren. Jedoch übersteigt in keinem Fall die Langlebigkeit der Implantate die der natürlichen Zähne [5].

Der Hauptgrund für das Setzen eines Implantates ist, neben der Nichtanlage von Zähnen, der Zahnverlust durch Extraktion. Laut Reich und Hiller (1993) ist bei den über 40-Jährigen der Hauptgrund der Zahnextraktionen die Parodontitis, bei den unter 40-Jährigen die Karies und die Extraktion des Weißheitszahnes [6]. In anderen Studien wurde allerdings auch bei den 60-80-Jährigen die Zerstörung der Zähne durch Karies als Hauptgrund der Extraktionen angegeben. Hier wurden parodontale Probleme nur bei 33% der Extraktionen als Ursache genannt [7]. Zudem zählt die Gingivitis als sehr starker Risikofaktor. Zähne die einer ständigen Gingivitis ausgesetzt sind haben ein signifikant höheres Risiko verloren zu gehen als Zähne die von gesundem Zahnfleisch umgeben sind [8].

1.1.2 Implantatverluste

Bei den Implantaten muss man zwischen den Frühverlusten und den Spätverlusten unterscheiden. Frühverluste treten in der Einheilphase oder in der frühen Belastungsphase auf und haben viele mögliche Ursachen wie etwa Planungs- bzw. Operationsfehler, Überhitzung des Knochens, schlechte Knochenqualität, Druckbelastung durch provisorischen Zahnersatz in der Einheilphase, Infektion, nicht bekannte Allgemeinerkrankungen und Implantatdislokation. Spätverluste treten in der Belastungsphase auf und unterscheiden sich zwischen Überbelastung bei inadäquater Implantatlänge, mangelhafter prothetischer Suprastruktur, unzureichender Mundhygiene und Periimplantitis. Generell ist die Erfolgsrate im Oberkiefer höher als im Unterkiefer, da hier die Knochenqualität und -quantität schlechter ist [9].

1.1.3 Periimplantitis

Entzündliche Veränderungen können in der Mundhöhle nicht nur an natürlichen Zähnen stattfinden, sondern auch rund um Zahnimplantate. Vor allem bakterielle Angriffe werden hierfür verantwortlich gemacht, sowie kaufunktionelle Überbelastung in Kombination mit Plaque. Ist die entzündliche Veränderung im periimplantären Weichgewebe nennt man es Mukositis, schreitet die Entzündung weiter bis auf den Knochen spricht man von Periimplantitis.

Die immunologische Antwort auf die bakteriellen Angriffe ist bei Zahnimplantaten ähnlich wie bei den natürlichen Zähnen. Allerdings ist das Fortschreiten der Destruktion stärker bei den Zahnimplantaten und das entzündliche Infiltrat breitet sich schneller bis zum Knochen aus. Nikotin oder ein schlecht eingestellter Diabetes mellitus stellen, wie bei der Parodontitis, ein Risiko dar. Auch die

Einleitung

Oberflächenbeschaffenheit des verwendeten Materials spielt eine Rolle. Auf einer Titanoberfläche lagert sich mehr Plaque an als auf einer Keramikoberfläche. Dies geschieht wegen des hohen elektrischen Bindungspotenzials der Passivierungsschicht von Titan. Auch auf freiliegenden rauen Oberflächen lagert sich mehr Plaque an und eine Periimplantitis wird begünstigt.

Die mikrobielle Flora der Mukositis und Periimplantitis ist der der Gingivitis und Parodontitis sehr ähnlich. Höhere Anteile an grampositiven Bakterien sowie geringere Keimzahlen sind bei der Periimplantitis zu finden. Vor allem die vorhandene Restbezahnung, Speichel, tiefe Taschen, Schleimhäute und Zungenfurchen (Nischen) haben einen großen Einfluss auf die vorhandenen Pathogene. [10]

Die Mundhöhle bietet vielen Bakterien gute Lebensbedingungen aufgrund ihrer warmen, feuchten Temperatur um 36°C, der regelmäßigen Nahrungsaufnahme und der festen Oberflächen zum Anhaften. Es entwickelt sich somit ein Biofilm auf den Oberflächen, der sich aus typischen Bakterienpopulationen zusammensetzt. Dieser muss einige Hindernisse überwinden wie etwa den ständigen Speichelfluss, das Gingivaexsudat, die Epitheldesquamation, die Reinigung während des Kauvorgangs sowie die Reinigung durch die tägliche Mundhygiene. Es bestehen vielfältige Nahrungsketten zwischen den Bakterien, sodass es sich um einen hoch komplexen Biofilm in der Mundhöhle handelt. Die Pathogenität in diesem Biofilm kann sehr unterschiedlich sein und sich sehr stark verändern. Als Biofilminfektion werden die Karies, die Parodontalerkrankungen und die Periimplantitis bezeichnet.

Pathogene Keime müssen spezifische Virulenzfaktoren aufweisen wie etwa die Adhäsion an Geweben des Wirts, Wachstum und Vermehrung innerhalb des Biofilms, Überleben der Abwehrreaktion des Wirts und aktive Destruktion des Gewebes. Diese Virulenzfaktoren der Bakterien einer Spezies können sehr stark schwanken [11]. Zu den parodontalpathogenen Mikroorganismen zählt unter anderem der „rote Komplex“, der sich aus den Bakterien *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Tannerella forsythia* (Tf) und *Treponema denticola* (Td) zusammensetzt. Als „oranger Komplex“ wird er bezeichnet, wenn man *Prevotella intermedia* (Pi) noch hinzuzählt. Zusammen mit dem *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* (Aa) beinhalten diese Komplexe den Hauptanteil der parodontalpathogen wichtigen Keime. Der Einzelnachweis von Keimen ist als relativ unbedeutend anzusehen [10]. In der Tabelle 1 sind alle Keime, die im Rahmen dieser Arbeit unter der unter 3. genannten kommerziellen Assay der Firma Bioscentia untersucht wurden, mit Angabe der Gramfärbung und des Stoffwechsels des jeweiligen Bakteriums, aufgelistet.

Tabelle 1: Keime, die in mikrobiologischer Diagnostik von der Firma Bioscentia erfasst wurden [10]

	Grampositiv (+)	Gramnegativ (-)
Fakultativ anaerob		<ul style="list-style-type: none"> - Aggregatibacter actinomycetemcomitans (Aa) - Capnocytophaga gingivalis (Cg) - Eikenella corrodens (Ec) - Treponema denticola (Td)
Anaerob	<ul style="list-style-type: none"> - Eubacterium nodatum (En) - Parvimonas micra (Pm) 	<ul style="list-style-type: none"> - Porphyromonas gingivalis (Pg) - Tannerella forsythia (Tf) - Prevotella intermedia (Pi) - Fusobacterium nucleatum (Fn) - Campylobacter rectus (Cr)

Neben den Keimen werden auch Botenstoffe („Zytokine/Chemokine“) im periimplantären Gewebe als möglicher Faktor angesehen, der die Periimplantitis beeinflussen kann. Als Zytokin-Quelle fungieren sowohl ortsständige Zellen als auch eingewanderte Komponenten eines entzündlichen Infiltrats, wie beispielsweise Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten. Dabei muss sowohl der „physiologische“ Anstieg der Zahl an Interleukinen nach einem chirurgischen Trauma und dem Setzen des Implantates bedacht werden, wie auch der Anstieg auf Basis einer bakteriellen oder einer Fremdkörperreaktion-bedingten Entzündung [12]. Es werden einerseits proentzündliche Zytokine wie IL-1, -6, -8 oder gegenregulatorisches IL-10 beschuldigt und andererseits auch der IL-1-Genotyp mit der Periimplantitis in Verbindung gebracht.

1.2 Allergie und Unverträglichkeitsreaktion

Der Begriff Unverträglichkeit ist ein „Sammeltopf“ für nicht-infekt-bedingte Gesundheitsbeschwerden, die beim Kontakt des Organismus mit „Fremdmaterial“ entstehen können. Nicht immer ist es leicht zu definieren, welche Reaktion normal ist. Betrachtet man beispielsweise das Thema „Nahrungsmittelunverträglichkeit“, so ergibt sich hier eine Vielzahl an möglichen Mechanismen von Enzymdefekten bis zu überschüssiger spezifischer Immunreaktion [13].

1.2.1 Definition der Allergie

Einleitung

Der Begriff „Allergie“ wurde 1906 erstmals von Clemens von Pirquet in die medizinische Fachwelt eingeführt. Er wollte mit diesem neuen Begriff das Phänomen der veränderten Reaktionsfähigkeit des Organismus auf einen erneuten Kontakt mit einem Allergen beschreiben, wofür es bis zu diesem Zeitpunkt noch keine angemessene Beschreibung gab. Das Wort Allergie setzt sich aus den griechischen Wörtern „allos“ und „ergon“ zusammen, welche soviel bedeuten wie „anders“ und „Verrichtung, Handlung“ [14].

Die meisten allergischen Reaktionen treten auf, wenn nach einem Kontakt mit einem Antigen oder Allergen diese Person, IgE-Antikörper produziert hat und dann erneut mit dem Allergen in Kontakt kommt. Dies trifft allerdings nur auf die ersten 3 Allergie-Typen zu und nicht auf den Allergie-Typ 4. Man kann die Allergien somit in 4 Typen einteilen. Diese Einteilung wurde 1963 von Coombs und Gell eingeführt und ist bis heute gültig. Bei den ersten 3 handelt es sich um Soforttyp-Reaktionen die durch Antikörper ausgelöst werden, bei der vierten handelt es sich um eine T-zellvermittelte Reaktion vom Spättyp [15], zu der auch die Metallallergie gehört.

J. Ring hatte die ursprüngliche Definition von Clemens von Pirquet erweitert formuliert als:

„Generell gilt, dass bei dem Erstkontakt mit „Fremd-Antigenen“ eine immunophile Auseinandersetzung stattfindet. Sofern diese über antigenpräsentierende Zellen im Kontakt eines präferentiellen Zytokinmoleküls und im Kontakt mit T-Lymphozyten stattfindet, kann eine spezifische Sensibilisierung gebahnt werden. Die dabei ausgebildeten Antikörper oder spezifischen T-Zellen können dann, bei erneutem Antigenkontakt, eine krankmachende spezifische Überempfindlichkeit („Allergie“) auslösen. Für die zellulär (T-Lymphozyten) vermittelte Spättypreaktion ist das allergische Kontaktekzem ein typisches Beispiel – mit Nickel als häufigstem auslösenden Allergen“ [16].

1.2.2 Metallallergie

Alle Metalle korrodieren in der Mundhöhle und geben Ionen ab, die die Fähigkeit besitzen als Allergene zu wirken und das Immunsystem zu aktivieren. Vor allem durch die Korrosion und die Abnutzung werden Metallionen freigesetzt. Metalle wie Nickel, Kobalt, Chrom, Beryllium und selten Tantal, Titan und Vanadium gelten als potenzielle Allergene. Nickel ist das häufigste Kontaktallergen, gefolgt von Kobalt und Chrom. Etwa 14% der Bevölkerung haben eine Nickelallergie [17]. Eine Allergie auf Metalle gehört zu den Überempfindlichkeitsreaktionen vom verzögerten Typ, den Typ-4-Reaktionen. Diese werden von T-Zellen vermittelt und benötigen in der Auslösephase oft Stunden bis Tage bis zur klinischen Manifestation. Unterschiedliche T-Zellen sind beteiligt. In der ersten Gruppe werden die Makrophagen durch Th1-Zellen aktiviert, was dann zur Entzündungsreaktion führt. In der zweiten Gruppe aktivieren die Th2-Zellen vor allem eosinophile Zellen und in der dritten Gruppe verursachen zytotoxische T-Zellen direkt die Schäden [15].

Gegenüber Edelstahl- oder Chrom-Kobalt-Molybdän-basierten Implantaten (speziell bei Osteosynthese oder Endoprothesen) wurden Komplikationen wie Ekzeme,

gestörte Wundheilung oder Entzündungsphänomene (Ergüssen, Osteolysen) in Assoziation mit Metallallergie beschrieben [18].

Demgegenüber wird Titan als „hypoallergenes“ Material betrachtet und es ist eine umstrittene Frage, ob allergische Reaktionen wirklich aufgrund von Titan entstehen.

In vielen Studien wurden bei Patienten mit Titan-Zahnimplantaten allergische Reaktionen wie etwa Ekzeme oder Hautausschlag beobachtet. Es bleibt allerdings eine umstrittene Frage ob diese allergischen Reaktionen wirklich aufgrund von Titan entstehen.

In den meisten Fällen handelt es sich bei den Materialien in der Zahnmedizin nicht um reines Titan, sondern weitere Metalle werden hinzugefügt um die mechanischen Eigenschaften des Werkstoffs zu verbessern. Diese Unreinheiten könnten die Ursache der allergischen Reaktionen sein. Elemente wie Beryllium, Nickel, Eisen, Kupfer, Kobalt, Chrom und Palladium waren in den Titan-Legierungen nachweisbar und sind als potenzielle Auslöser der allergischen Reaktionen in Betracht zu ziehen. Es bleibt somit unbewiesen ob Titan die Ursache für allergische Reaktionen bei Patienten mit Implantaten ist [19].

Es ist aber denkbar, dass freigesetzte Titanionen einen Metall-Protein-Komplex bilden, somit immunogen wirken und eine spezifische Immunreaktion auslösen.

Es gibt vereinzelte Fallberichte über Schmerzen, Hautveränderungen und -entzündungen, gestörte Wundheilung und sterile Osteomyelitis. Fage et. al sowie Hallab et. al geben hierzu einen Überblick [20, 21]. Es findet demnach eine T-lymphozytäre Antwort statt, welche auf eine immunologische Reaktion Typ-4 hindeutet. So kann, in Abwesenheit von jeglichen Bakterien, ein Entzündungsprozess rund um die Implantatregion stattfinden in der die Lymphozyten sich angesammelt haben und schließlich sogar zur Osteolyse führen [22]. Die Literatur über Titanimplantat-Verluste durch Hypersensibilitätsreaktion/Allergien auf das Metall Titan ist sehr gering. Dennoch wird dieses Thema oft sehr emotional durchleuchtet [23].

1.2.3 Unverträglichkeitsreaktion

Wie oben ausgeführt ist der Begriff „Unverträglichkeitsreaktion“ als aseptische Reaktion auf Fremdmaterial breiter gefasst und betrifft auch aseptische Entzündungsreaktionen auf Implantat-Abriebpartikel. Sowohl die Partikelmenge, die Partikelform, die Partikelgröße als auch die chemischen Eigenschaften der Partikel spielen eine Rolle. Die Entzündungsreaktion ist demnach stärker, je höher die Menge der Partikel und je kleiner die Partikelgröße. Das Aufnehmen der Partikel in die Zelle ist ein essenzieller Schritt für die Auslösung einer Entzündungsreaktion. Kleine Partikel im Nanometerbereich (unter 150 nm) werden einfacher von den Zellen mittels Endozytose oder Pinozytose aufgenommen als größere Partikel (150nm – 10 Mikrometer). Diese werden jedoch auch von einer Reihe von Zellen mittels Phagozytose aufgenommen, unter anderem von Makrophagen, Osteoblasten, Fibroblasten und Endothelzellen [17]. Es konnte auch bewiesen werden, dass Partikel, die durch Phagozytose aufgenommen werden, die Produktion proinflammatorischer Zytokine auslösen können. Was die Form der Partikel angeht, sind die „faserigen“ stärker proinflammatorisch als die runden Partikel. Die nadelförmigen Partikel lösen die stärkste proinflammatorische Reaktion aus [24]. Auch die Rauheit der Oberfläche scheint sich fördernd auf die proinflammatorische Wirkung auszuwirken [25].

Indem die Metallpartikel nun in der Zelle, dem Makrophagen, aufgenommen wurden, laufen eine Reihe von Schritten ab, die zu einer Entzündungsreaktion führen. In Abb.1, entnommen aus dem Artikel von Hallab et. al, sieht man die unterschiedlichen Abläufe in dem Makrophagen nach der Aufnahme von solchen Metallpartikeln. Es kommt zur Inflammasom-Aktivierung welche über die Caspase-1 zur Produktion von aktivem IL-1beta führt. Über den Transkriptionsfaktor NFkappaB kommt es zu einer vermehrten Produktion und Sekretion der Zytokine IL-6 und TNFalpha. Eine gesteigerte Entzündungsreaktion ist die Folge. Zusätzlich werden durch die vermehrte Ausschüttung von IL-1beta, TNFalpha, IL-6 sowie IL-8 aufgrund der Phagozytose der Abriebpartikel, die Osteoklasten, die den Knochen resorbieren, stimuliert. Außerdem behindern die Partikel, dass sich mesenchymale Stammzellen zu funktionellen Osteoblasten entwickeln. Es kommt also zum Knochenabbau. Auch die Kollagensynthese der ausgereiften Osteoblasten ist gestört und die Apoptose der Osteoblasten wird induziert [17].

Angesichts der zunehmenden Verwendung von dentalen Titanimplantaten konnten im Rahmen einer Multizenterstudie der Deutschen Gesellschaft für Zahnimplantologie (DGI), Aspekte der Titanimplantatverträglichkeit bearbeitet werden. Dies führte zur Fragestellung der hier vorgelegten Arbeit.

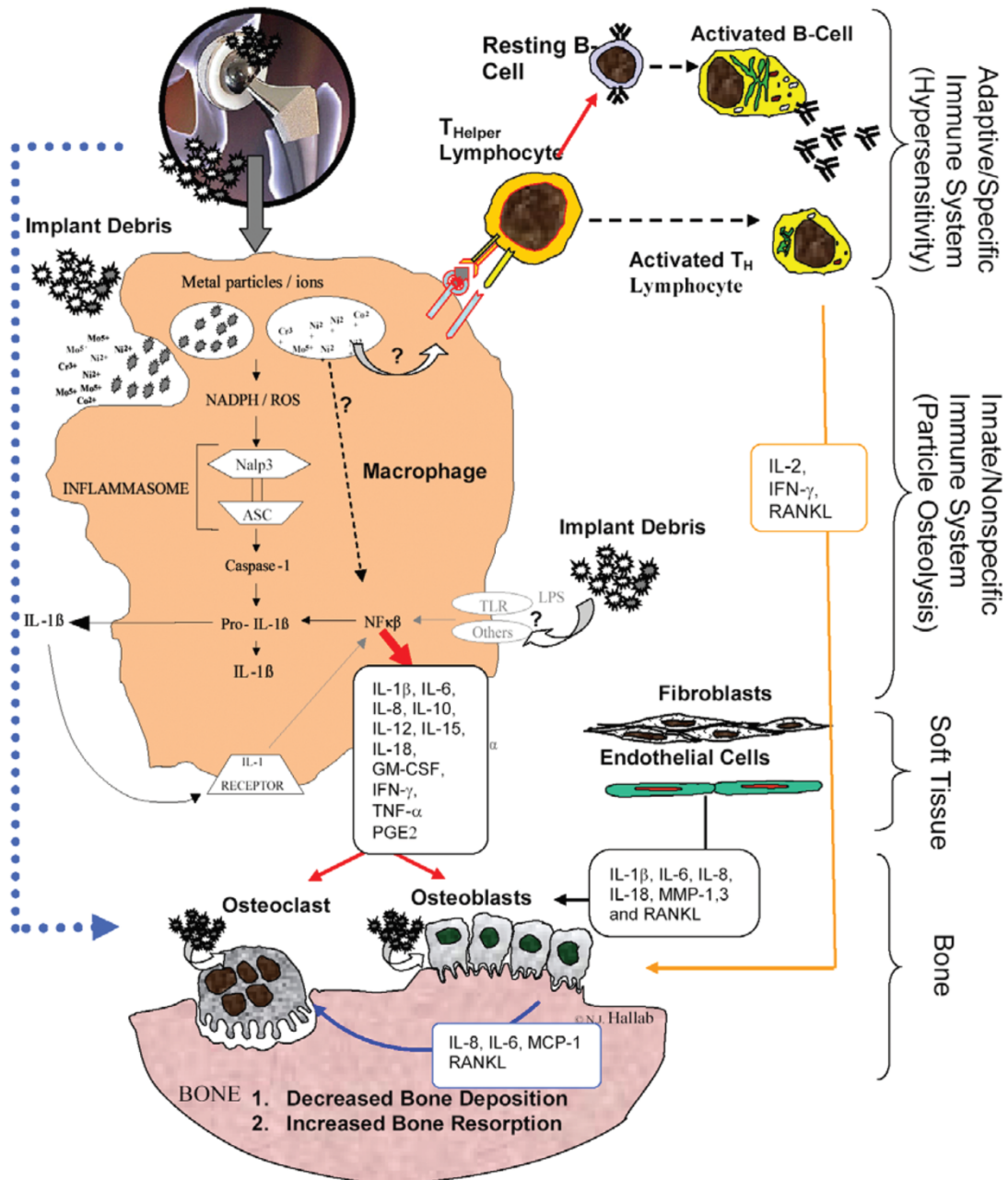


Abbildung 1 Metallpartikel induzierter Entzündungsablauf im Makrophagen [17]

2 Fragestellung

Im Rahmen der Nachsorge („Recallprogramm“) bei Titanimplantat Trägern, wurden standardisiert klinische Parameter, aber auch Mikrobiologie und In-vitro-Parameter bei einer größeren Patientengruppe erhoben.

Somit konnten, sowohl bei Beschwerdefreiheit wie auch bei gefundenen Beschwerden, speziell Aspekte der Zytokinreaktivität gegenüber Titan beurteilt werden. Wir stellen folgende Fragen:

- Welche Zytokinproduktion in vitro ist erkennbar, wenn periphere Blut-mononukleäre Zellen (PBMC; enthalten Monozyten und Lymphozyten) von Titanimplantatträgern mit Titanpartikeln oder Titan- Materialplättchen exponiert werden.
- Führen Titanpartikel unterschiedlicher Form und Größe zu unterschiedlicher Zytokinproduktion?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen dem IL-1-Genotyp des Patienten und einer Implantatunverträglichkeit oder ein Zusammenhang zwischen dem IL-1-Genotypen und der Zytokinproduktion des Patienten?
- Hat die periimplantäre bakterielle Besiedlung Einfluss auf die Zytokinproduktion und wenn ja, welche Bakterien spielen hier eine besondere Rolle und auf welches Zytokin haben sie eine Wirkung?

3 Material und Methoden

3.1 Patienten

Für diese Arbeit wurden insgesamt 136 Patienten im Alter von 24 bis 84 Jahren ausgewählt, die im Rahmen der DGI-Studie „Retrospektive Untersuchung zur Erfolgssicherheit oraler Implantate“ mitgewirkt haben und deren Untersuchungsdaten bereits komplett vorlagen. Die „DGI-Studie“ ist eine Multicenter-Studie, die von der Deutschen Gesellschaft für Implantologie im Zahn- Mund- und Kieferbereich getragen wird. Ein positives Ethikvotum hat vorgelegen. Alle personenbezogenen Daten und Bilder sind anonymisiert und pseudonymisiert und wurden verschlüsselt übertragen, so dass keine Daten abgefangen werden konnten. Die Datenerhebung hat am 01.01.2012 begonnen. Es handelt sich insgesamt um Personen mit Titan-Zahnimplantaten, die im Rahmen eines „Recall-Programms“ Nachuntersuchungen zu Klinik, Mikrobiologie, Gen-Polymorphismen und Zellaktivität peripherer Blutzellen auf Titanmaterialien erhielten. Der letztgenannte Aspekt wurde in unserem Labor an der Münchner Universitätshautklinik bearbeitet.

Tabelle 2: Patientendaten

	N	N (%)	Alter Min	Alter Max	Alter Mittelwert	Standardabweichung
männlich	58	42,65	25	84	64,5425	±12,47
weiblich	78	57,35	24	82	64,557	±12,24
insgesamt	136	100	24	84	64,557	±12,29

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Patienten stammen von 7 verschiedenen Zentren:

- PD Dr. Gerhard Iglhaut
– Bahnhofstraße 20, D-87700 Memmingen
- PD Dr. Michael Stimmelmayer
– Josef-Heiligenbrunner-Straße 17, D-93413 Cham
- PD Dr. Werner Lill
– Kloostergasse 37, A-1180 Wien
- Gemeinschaftspraxis Dr. Kirsch/ Dr. Ackermann
– vertreten durch Dr. Karl-Ludwig Ackermann
– Talstraße 23, D-70794 Filderstadt

Material und Methoden

- Prof. Dr. Dr. Hendrik Terheyden
- Hansteinstraße 29, D-34121 Kassel
- PD Dr. Ata Anil - Praxis Dr. Peter Mohr
- Thilmanystr. 5, D-54634 Bitburg
- Dr. Torsten S. Conrad
- Heinrichstraße 10, D-55411 Bingen

Bei jedem Patienten wurde eine ausführliche klinische Untersuchung rund um das Zahnimplantat erhoben. Es wurden mithilfe des „impDat-Programms“ vom Hersteller Kea Software folgende Werte festgehalten:

- Schmerzen
- Mobilität
- Lockerung
- Komplikationen
- Implantat-Komplikationen
- Wundheilung
- Sondierungstiefen (6-Punkt-Messung)
- Knochenabbau
- PSI
- PBI
- BOP (6-Punkt-Messung)
- Plaque
- Implantatregion
- Implantattyp
- Implantat-Durchmesser
- Implantatlänge
- Implantatoberfläche
- Implantatform
- Indikation
- Implantationszeitpunkt
- Knochenqualität

Der Raucherstatus konnte zum Zeitpunkt der Auswertung noch nicht festgelegt werden und wurde somit in dieser Studie nicht berücksichtigt.

Zusätzlich wurde bei jedem Patienten eine Probe von heparinisiertem peripheren venösen Blut erhalten, die in der Dermatologischen Klinik in München in dem Allergologie-Forschungslabor verarbeitet wurde. Mithilfe von durchflusszytometrischen Analysen wurde die Zytokinproduktion auf unterschiedliche Stimulanzen untersucht (Details siehe nachfolgend).

Material und Methoden

Es wurden auch Proben mithilfe von Papierspitzen und Abstrichen aus der Mundhöhle entnommen. Sowohl von der periimplantären Sulkusflüssigkeit als auch von der Wangenschleimhaut. Diese Proben wurden über kommerziell verfügbare Routine-Testsets (Firma Bioscentia) untersucht, welche eine mikrobiologische Diagnostik, eine molekulargenetische Diagnostik des IL-1-Genotypen und eine Messung des MMP-8 (Kollagenase 2) ermöglichten.

Bei der mikrobiologischen Diagnostik über den Diagnostik-Teststreifen der Firma Bioscentia wurde die Anwesenheit folgender Keime untersucht:

- *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa)
- *Porphyromonas gingivalis* (Pg)
- *Prevotella intermedia* (Pi)
- *Tannerella forsythia* (Tf)
- *Treponema denticola* (Td)
- *Parvimonas micra* (Pm)
- *Fusobacterium nucleatum* (Fn)
- *Campylobacter rectus* (Cr)
- *Eubacterium nodatum* (En)
- *Eikenella corrodens* (Ec)
- *Capnocytophaga gingivalis* (Cg)

Bei der molekulargenetischen Diagnostik wurden folgende Allele des IL-1-Genotyp untersucht:

- Interleukin 1A: -Allel 1 (-C889) –Allel 2 (-889T)
- Interleukin 1B: -Allel 1 (+C3953) –Allel 2 (+3953T)
- Interleukin 1RN: -Allel 1 (+T2018) –Allel 2 (+2018C)

Anhand der eingeschickten und ausgewerteten Testkits wurde zusätzlich ein individuelles genetisches Parodontitisrisiko von der Firma Bioscentia erstellt, welches folgendermaßen definiert wurde:

- Genotyp 1: Patient mit normaler Entzündungsreaktion. Kein erhöhtes genetisches Risiko für progressive Parodontitis.
- Genotyp 2: Patient mit erhöhter Entzündungsreaktion. Erhöhtes genetisches Risiko für progressive Parodontitis
- Genotyp 3: Patient mit stark erhöhter Entzündungsreaktion. Stark erhöhtes genetisches Risiko für progressive Parodontitis.
- Genotyp 4: Patient mit genetisch bedingter verminderter Entzündungshemmung, häufig bei Periimplantitis.

Insgesamt erfolgten die klinischen Untersuchungen gemäß bekannter Routinemaßnahmen und die labortechnischen Untersuchungen anhand „auf dem

Markt befindlicher“, zugelassener Diagnostika. Ergänzend hierzu wurde ein experimenteller Forschungsansatz durchgeführt, über den, anhand heparinisierten Fremdblutproben, die Blutzellreaktivität in vitro gegen Titanmaterialien beurteilt wurde. Auf diesen Forschungsparameter wird im Rahmen der hier beschriebenen Arbeit eingegangen.

3.2 Versuchsüberblick und Zellgruppen

Frische, heparinisierte periphere Venenblutproben mussten unter sterilen Bedingungen innerhalb von 24 Stunden bei Raumtemperatur weiterverarbeitet werden. Dabei wurden entweder insgesamt PBMC (= periphere Blut-mononukleäre Zellen; vornehmlich Monozyten und Lymphozyten) nach Dichtegradienten-Zentrifugation für Folgeversuche eingesetzt oder Zell-Subgruppen (T-Lymphozyten, Monozyten) nach Aufreinigung verwendet. Die Folgeversuche bestanden aus steriler Kultur in supplementiertem Zellkultur (RMPI-1640) –Medium über 3 Tage (72h) bei 37°C und CO₂/O₂-Anpassung unter Zugabe unterschiedlicher Stimulantien. Die Zellkulturüberstände wurden ausliefernd bezüglich enthaltener Zytokine analysiert.

3.2.1 Isolierung der Zellen

Die Arbeiten wurden am Steril-Arbeitsplatz durchgeführt. Die Isolierung der Monozyten sowie der T-Zellen erfolgte nach demselben Protokoll, weshalb hier nur anhand der Monozyten der Vorgang der Zellisolierung erläutert wird.

3.2.1.1 Einleitung

Zur Isolierung der Zellen wurde das magnetische Zelltrennungssystem „MACS“ (Miltenyi Biotec GmbH) verwendet. Dieses System nutzt das Prinzip der negativen Selektion, indem die nicht benötigten Zellen entfernt werden. Nur die unberührten Monozyten aus den mononukleären Zellen des peripheren Blutes wurden isoliert. Alle übrigen Zellen wurden entfernt, indem sie indirekt magnetisch markiert wurden. Dazu wurden sie zuerst mit einem monoklonalen Biotin-konjugierten Antikörper gekoppelt und anschließend mit einem passenden Sekundärantikörper, der mit einem Magnetpartikel versehen war, zusammengefügt. Waschvorgänge zwischen diesen zwei Schritten der Markierung waren nicht nötig. Diese magnetisch markierten Zellen, die nun durch das hochgradiente Magnetfeld laufen, bleiben an den Stahlkugeln hängen, während die unmarkierten einfach durchlaufen. Das hochgradiente Magnetfeld wird erzeugt, indem eine aus ferromagnetischen Stahlpartikeln bestehende Säulenmatrix eingeführt wird. So werden alle Zellen, bis auf die Monozyten, entfernt.

3.2.1.2 Durchführung

Material und Methoden

Zuerst mussten die mononuklearen peripheren Blutzellen von dem antikoagulierten peripheren Blut isoliert werden. Dies geschah mithilfe der Dichtegradientenzentrifugation. Danach wurden die Zellen in einem Puffer resuspendiert und nochmals für 10-15 Minuten bei 20°C und 200 U/min zentrifugiert.

Danach konnten die Zellen magnetisch markiert werden. Wichtig hierbei war darauf zu achten, die Zellen ausreichend zu kühlen, damit die Antikörper sich nicht unspezifisch an die Zellen binden. Auch sollten Zellklumpen vermieden werden, weshalb man davor mit einem 30 µm Netz aus Nylon das Blut sieben kann.

Schritte der Markierung:

- Zellzahl bestimmen
- Für 10 Minuten bei 300 U/min zentrifugieren, anschließend den kompletten Überstand abpipettieren
- Zellen in Puffer resuspendieren (30µl/ 10^7 Zellen)
- „Blocking Reagent“ hinzufügen (10µl/ 10^7 Zellen)
- „Biotin-Antikörper Cocktail“ hinzufügen (10µl/ 10^7 Zellen)
- Gut vermischen und bei 4-8°C inkubieren
- Puffer hinzufügen (30µl/ 10^7 Zellen)
- „Anti-Biotin MicroBeads“ hinzufügen (20µl/ 10^7 Zellen)
- Gut vermischen und für weitere 15 Minuten bei 4-8°C inkubieren
- 1-2 ml Puffer hinzugeben und bei 300 U/min für 10 Minuten zentrifugieren.
- Den Überstand wieder vollständig entfernen
- Die Zellen in 500µl Puffer resuspendieren

Nach dem Schritt der Markierung konnte nun die magnetische Isolierung stattfinden. Man musste den korrekten MACS-Separator und die korrekte Säulenmatrix zu der passenden Zellzahl auswählen:

Tabelle 3: MACS

Säulenmatrix	Maximalzahl an markierten Zellen	Maximalzahl an gesamten Zellen	MACS-Separator
MS	10^7	2×10^8	MiniMACS, OctoMACS, VarioMACS, SuperMACS
LS	10^8	2×10^9	MidiMACS, QuadrMACS, VarioMACS, SuperMACS
XS	10^9	2×10^{10}	SuperMACS

Für diese Arbeit wurde die Säulenmatrix MS verwendet.

Schritte der magnetischen Isolierung:

- Korrekte Säulenmatrix in das Magnetfeld einbringen
- Säulenmatrix mit Puffer ausspülen (MS: 500µl)
- Zellsuspension in die Säulenmatrix geben
- Säulenmatrix wieder mit korrekter Menge an Puffer waschen. Diesen Vorgang dreimal wiederholen, jedes Mal wenn die Säule wieder leer ist. (MS: 3x500µl)
Den ganzen Ausfluss im gleichen Behälter auffangen.

Man hat nun nur die Monozyten aufgefangen und sie von den restlichen Zellen isoliert.

3.3 Stimulantien

Nach der Trennung der Zellen in die Zellgruppen PBMC, T-Zellen und Monozyten, wurden die Zellen mit der Zellzahl 1Mio/ml im supplementierten Zellkulturmedium resuspendiert und in 96-well-Zellkulturplatten mit Zugabe verschiedener Stimulantien über 3 Tage inkubiert. Stimulantien waren LPS-freie Titanmaterialien beziehungsweise Kontrollstimuli:

Titan-Partikel (Anatase):	1×10^{-4} M
	5×10^{-5} M
	1×10^{-5} M

Titan-Partikel (Rutil):	1×10^{-4} M
	5×10^{-5} M
	1×10^{-5} M

Im Folgenden werden die Strukturen Rutil und Anatase kurz erläutert.

Titan-Plättchen (Straumann)

Titan- Plättchen (Dentsply)	Friadent GmbH, Titankörper Grad 2 D6/H1.75; Gestrahlt/geätzt
-----------------------------	--

TT (Tetanus Toxin)

PMA+Ionomycin	15 ng/ml bzw. 1,5 mikrogramm/ml
---------------	------------------------------------

LPS

20 ng/ml

Bis zur Durchflusszytometrie-Messung wurden die Zellkulturüberstände bei -20°C aufbewahrt.

Titandioxid findet man in 3 Kristallstrukturen wieder, in der „Rutil“- , „Anatase“- und „Brookit“-Struktur.

Unter „Rutil“-Struktur versteht man eine bestimmte kristalline Form von Titandioxid, bestehend aus Titan-Kationen und Oxid-Anionen. Es ist die Form der Titandioxide, die am häufigsten natürlich auftritt.

Unter „Anatase“-Struktur verbirgt sich eine weitere Titandioxid-Kristallstruktur, die nur selten natürlich vorkommt.

Das Grundgerüst bei „Rutil“ sowie bei „Anatase“ besteht aus einem Titan Atom, umgeben von 6 Sauerstoffatomen, die in einer mehr oder weniger verzerrten oktaedrischen Konfiguration dieses Titan Atom umgeben. Es handelt sich um eine tetragonale Kristallstruktur. Die „Rutil“-Struktur hat eine geringere Oberflächenenergie als die „Anatase“-Struktur und ist somit als stabiler anzusehen.

Die „Brookit“-Struktur liegt rhomboedrisch vor und spielt in der Verwendung von Titandioxiden eine untergeordnete Rolle [26-28]. Die von uns verwendeten Partikel sind kommerziell erhältlich bei Sigma Aldrich in Darmstadt, Deutschland.

3.4 Lösungen für die FACS-Analyse

- FACS Clean
- FACS Flow
- FACS Shutdown Solution

- Human Soluble Protein Master Buffer Kit: - Instrument Setup Reagents
 - Wash Buffer
 - Assay Diluent
 - Detection Reagent Diluent
 - Capture Bead Diluent

- Human (IL-1beta, IL-8, IL-5, IL-10, IL-6, IL-4, IL-17, TNF-alpha, IFN-gamma) Flex Set
 - Human Capture Bead
 - Human PE Detection
 - Human Standard

3.5 Geräte

Material und Methoden

Hettich Zentrifuge, Rotana 460 R
Vortex, Snijders-press-to-mix
Vortex Genie 2
Kühlschrank Liebherr (4°C)
Kühltruhe Liebherr (-21°C)
BD FACS Canto

3.6 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Pipettenspitzen: Biosphere Filter Tips (2-100µl), Safe Seal Tips Professional (100µl)
steril
Rundboden Röhrchen (5ml) Länge: 75mm, Durchmesser: 12 mm
Safe Seal Reagiergefäße (1,5 ml)
Eppendorf: Multipipette plus
Eppendorf Reference (0,5-10 µl; 2-20µl; 1-100µl)

3.7 Durchflusszytometrie

3.7.1 Einführung

Das Durchflusszytometermodell wird auch noch FACS-Gerät genannt was für „fluorescence activated cell sorter“ steht. Mit dieser Methode ist es möglich, verschiedene mikroskopisch kleine Partikel anhand ihrer Größe, Struktur, Oberflächeneigenschaften und intrazellulären Zusammensetzung zu unterscheiden. Es handelt sich in der Immunologie in der Regel um Zellen oder antikörpergekoppelte Mikropartikel (Beads). Die Markierung der Zellen oder Mikropartikel mit spezifischen Antikörpern ist Voraussetzung. Diese Antikörper sind entweder direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt oder es muss zusätzlich ein fluoreszenzgekoppelter Sekundärantikörper hinzugefügt werden. Die zweite indirekte Markierung wurde bei dieser Arbeit verwendet, da hier ja Zellkulturüberstände im „Multiplet“ Verfahren unter Verwendung von „Microbeads“ analysiert werden.

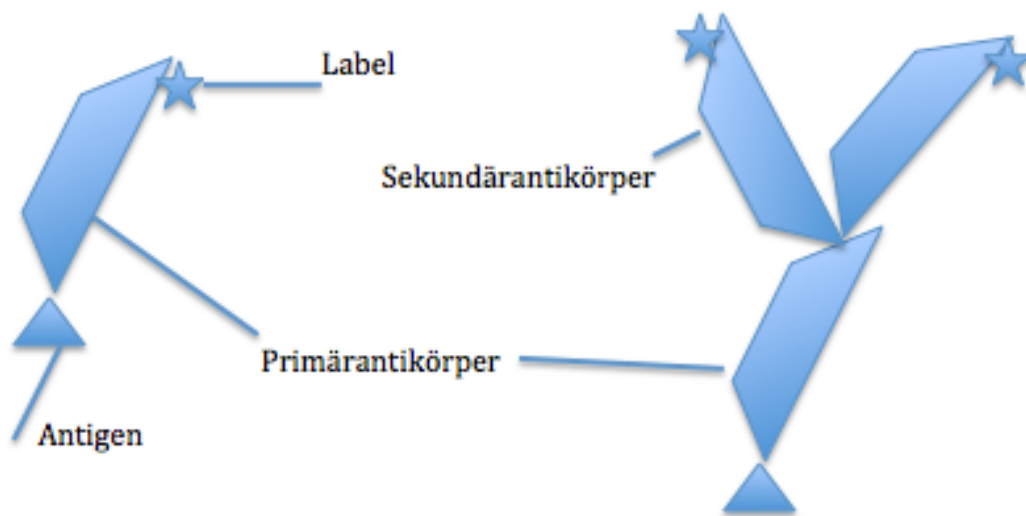


Abbildung 2: Links: Direkte Methode, der Primärantikörper ist bereits mit einem Fluorochrom gelabelt. Rechts: Indirekte Methode, der Sekundärantikörper ist gelabelt und bindet an den ungelabelten antigenspezifischen Antikörper (Quelle: Abb. eigenständig angefertigt mithilfe des Word-Programms)

Ist die Markierung erfolgt, kann gemessen werden. Dies geschieht im Durchflusszytometer mithilfe eines Laserstrahls. Es kommt zur Lichtstreuung und zur Anregung der gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe, die daraufhin Licht einer definierten Wellenlänge emittieren, welches durch ein komplexes System aus Spiegeln und Filtern gebündelt und zerlegt wird. Man bekommt also ein spezifisches Signal für jeden unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff.

Mit dieser Methode ist es möglich, innerhalb kürzester Zeit, tausende Partikel in einem laminaren Probenstrom, einzeln an einem Laser vorbeizuleiten, was einen enormen Zeitgewinn darstellt.

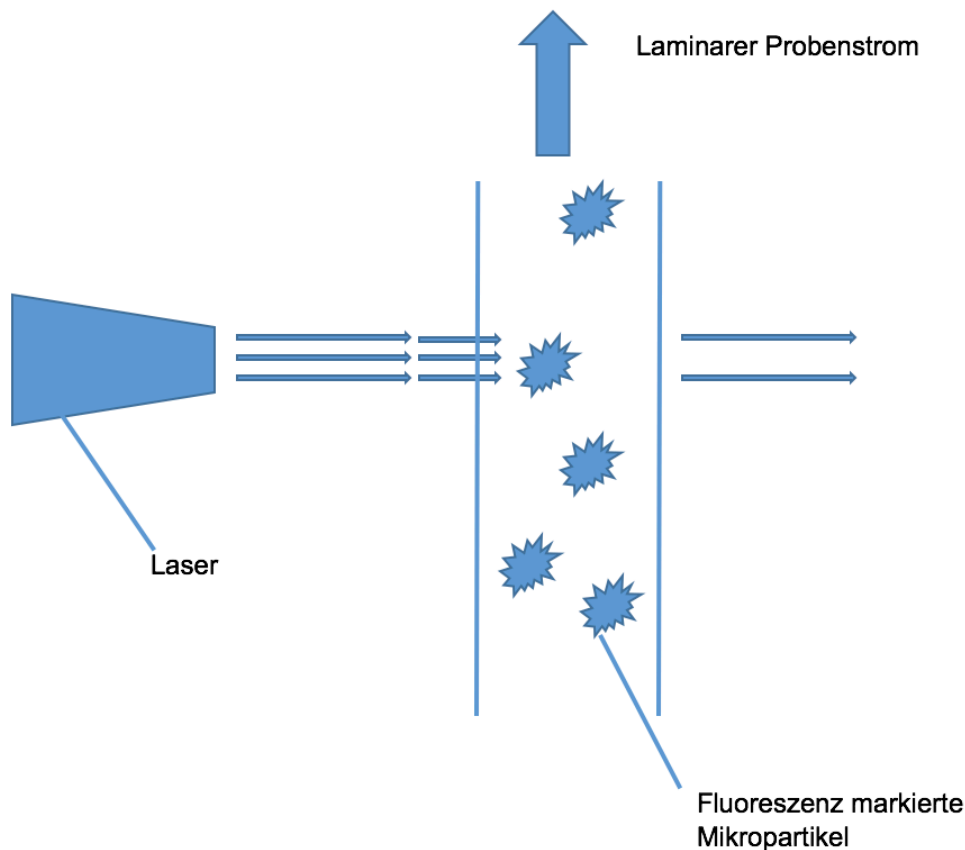


Abbildung 3: Ein laminarer Probenstrom wird an einem Laser vorbeigeleitet (Quelle: Abb. eigenständig angefertigt mithilfe des Word-Programms)

Es gibt viele unterschiedliche Laser mit unterschiedlichen Wellenlängen. Wichtig ist, dass nur Licht einer bestimmten Wellenlänge, monochromatisches Licht, ausgesendet wird. Bei dieser Arbeit wurde das BD FACSCanto Gerät benutzt, in welchem 3 Laser integriert sind, ein blauer Laser (488nm), ein roter Laser (633nm) und ein violetter Laser (405nm).

Neben dem Laser ist das optische System des Durchflusszytometers von Bedeutung. Es besteht aus Linsen, Spiegeln, Filtern und Detektoren. An der Fokussierungslinse wird das vom Laser ausgesandte Licht gebündelt, bevor es auf den Probenstrom trifft.

Für die Fluoreszenz hat man auch mehrere Fluorochrome zur Auswahl, die sich durch unterschiedliche Wellenlängen ihrer Absorptions- und Emissionsspektren unterscheiden. Für diese Arbeit wurde der gängige Fluoreszenzfarbstoff „Phycoerythrin“ (PE) verwendet. Dieser hat ein Emissionsmaximum bei etwa 578 nm. Es ist bei der Auswahl der Fluorochrome unbedingt darauf zu achten, dass diese keinen Einfluss auf die zu untersuchenden Partikel haben und sich nicht direkt an diese binden.

3.7.2 Erstellen der Standardreihe

Es wurde das Verfahren „cytometric beads array (CBA)“ unter Verwendung des kommerziellen Sets (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) eingesetzt. Zunächst mussten Standardkurven als Referenz für die spätere Messung erstellt werden.

Es erfolgte das Erstellen eines sogenannten Top Standard zum Erlangen einer Standard-Kurve. Hierzu wurde jeweils ein gefriergetrocknetes Standard einer definierten Konzentration der Interleukine IL-4, IL-8, IL-17A, IL-6, IL-1beta, IL-10, IL-5, IFN-gamma, TNF-alpha (1µg), in einem Reagenzglas zusammengemengt und mit 4 ml Assay Diluent verdünnt. Dieses Standard durfte ausschließlich mit der Pipette vermischt werden, nicht jedoch mit Hilfe des Vortex-Gerätes, und wurde für 15 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Verdünnung, beginnend bei Reagenzglas 1, in welchem nur der Top Standard unverdünnt vorhanden war, bis hin zur negativen Kontrolle, in welchem ausschließlich Assay Diluent vorhanden war. Die restlichen Röhrchen enthielten die Konzentrationen von 1:2 bis 1:256, und die Proteinkonzentrationen nahmen dementsprechend ab.

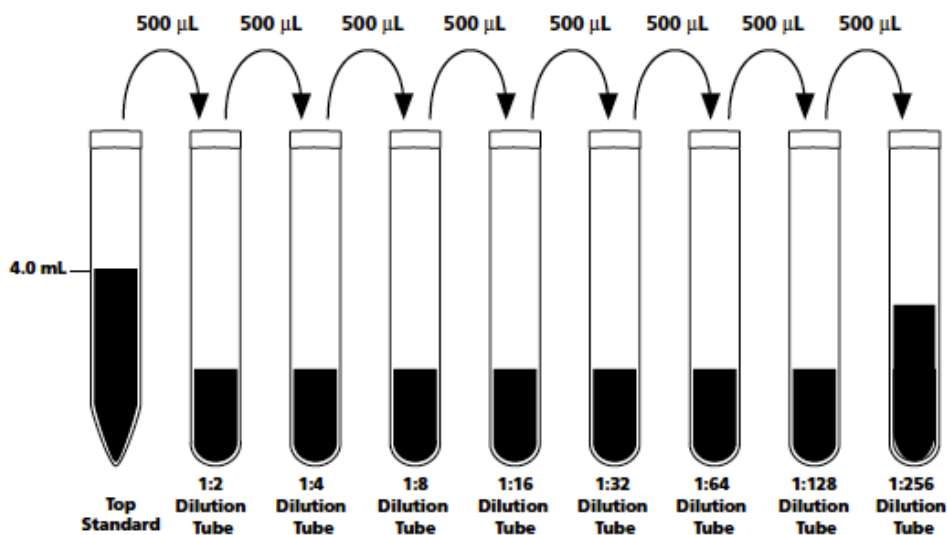


Abbildung 4: Präparation der Standardreihe (Quelle: Human Soluble Protein Master Buffer Kit; Instruction Manual)

Es ist wichtig, dass die 10 ersten Röhrchen beim Messen immer die Standards sind. Eine Standardreihe wurde für mehrere Messungen verwendet, bevor wieder neue Standards erstellt wurden.

3.7.3 Erstellen der Proben für die Durchflusszytometrie

Zunächst mussten die Primärantikörper mit den „Zellkulturüberstand-Proben“ zusammengebracht werden. Hierfür wurden die „Mixed Capture Beads“ vorbereitet, bestehend aus den 9 verschiedenen „capture beads“ und dem „capture bead diluent“. Es war besonders auf das ausreichende vortexen von 15 Sekunden zu achten, um die Beads ausreichend zu resuspendieren. Nun konnten die „Mixed Capture Beads“ mit den Proben vermischt werden und bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubieren. In der Zeit sollten sich die Beads mit den jeweiligen Interleukinen verbinden.

In der Zwischenzeit wurden die „Mixed PE Detection Reagents“ vorbereitet, indem die „Detection Reagents“ mit dem „Detection Reagent Diluent“ in einem Röhrchen zusammengefügt wurden. Dieses musste bis zum Gebrauch im Kühlschrank bei 4°C unter Lichtschutz (Aluminiumpapier) aufbewahrt werden. Anschließend konnten die „Mixed PE Detection Reagents“ zu den Proben hinzugefügt werden, und unter Lichtschutz für 2 Stunden inkubieren. Dies gewährleistet, dass sich die mit Fluoreszenz konjugierten Sekundärantikörper mit den passenden Primärantikörper-gebundenen Interleukinen verbinden. Der Sekundärantikörper erkennt und bindet den konstanten Fc-Teil des unmarkierten Primärantikörpers, was voraussetzt, dass dieser spezifisch für den Primärantikörper sein muss.

Nach den 2 Stunden Inkubation erfolgte der Waschvorgang, indem zuerst 250µl Waschpuffer in jede Probe hinzugefügt wurde. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 300 U/min zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und mit 150µl Waschpuffer resuspendiert. Dieser Waschvorgang ist von großer Bedeutung und stellt sicher, dass die nicht gebundenen Antikörper entfernt werden und störende Hintergrundemissionen vermieden werden. Die Proben waren nun bereit für die Durchflussszytometrie-Messungen.

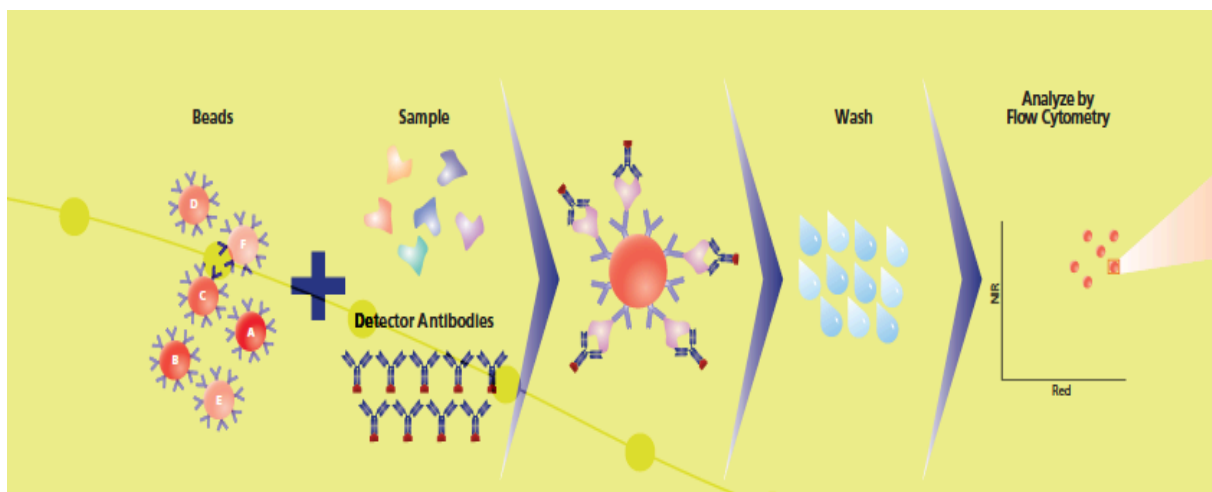


Abbildung 5: Durchflussszytometrie-Ablauf (Quelle: BD Cytometric Bead Array; Multiplexed Bead-Based Immunoassays)

3.7.4 Messung



Abbildung 6: BD Facs Canto Gerät (Quelle: Aufnahme erfolgte am Arbeitsplatz der Universitätshautklinik in München)

An dem FACS-Gerät ist ein Flüssigkeitsversorgungssystem angeschlossen, welches unter Druck gesetzt werden muss um einen laminaren Probenfluss zu gewährleisten. Das System beinhaltet die Trägerflüssigkeit in einem Vorratsbehälter und einen Abfalltank, der die Flüssigkeit nach Durchlaufen, wieder aufammelt. Dieser sollte bei Beginn der Durchführung leer sein. Vor dem Messen sollte man das System mit destilliertem Wasser durchlaufen lassen, um eventuell noch vorhandene Partikel herauszuspülen. Luft in den Schläuchen ist auch unbedingt zu vermeiden.



Abbildung 7: Messung einer Probe (Quelle: Aufnahme erfolgte am Arbeitsplatz der Universitätshautklinik in München)

Die FACS Messergebnisse wurden mit der geräteeigenen Software ausgewertet.

3.7.5 Statistik

Bezüglich der statistischen Auswertung wurde mit folgenden Programmen gearbeitet:

- SPSS
- GraphPad Prism

Die einzelnen Tests werden bei den Ergebnissen mit erläutert. Als signifikant wurden p-Werte $< 0,05$ erachtet.

4 Ergebnisse

Zum Zeitpunkt der Datenauswertung lagen Informationen zu 136 Personen vor. Diese umfassten: Allgemeine Anamnesedaten; die klinischen Befunde zu den untersuchten Mundschleimhaut-/Gingiva-Bereichen in Bezug auf den Implantatbereich; Abstrichergebnisse; Auswertung von kommerziellen Teststreifen für MMP-8 und „Genotyp-Analyse“; Auswertung der In-vitro-Zytokinfreisetzung der isolierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) der Patienten. Um die erhaltenen Zytokinmesswerte zusätzlich in Bezug auf „In-vivo-Gelegenheiten“ der Patienten zu beurteilen, wurde die Auswertung der vor Ort gefundenen Keimbesiedlung und „auffälliger/unauffälliger klinischer Befund“ mit einbezogen.

4.1 Vergleich TiO_2 -Rutil-Partikel mit TiO_2 -Anatase-Partikel und Titanplättchen

Eine Zielsetzung dieser Arbeit war, mögliche interindustriell unterschiedliche Reaktionen der PBMC auf TiO_2 -Rutil- und Anatase-Partikel sowie auf die Titanplättchen zu erkennen. Zur Auswertung der Ergebnisse wurde ein T-Test bei unabhängigen Stichproben im Programm SPSS durchgeführt.

Ergebnisse

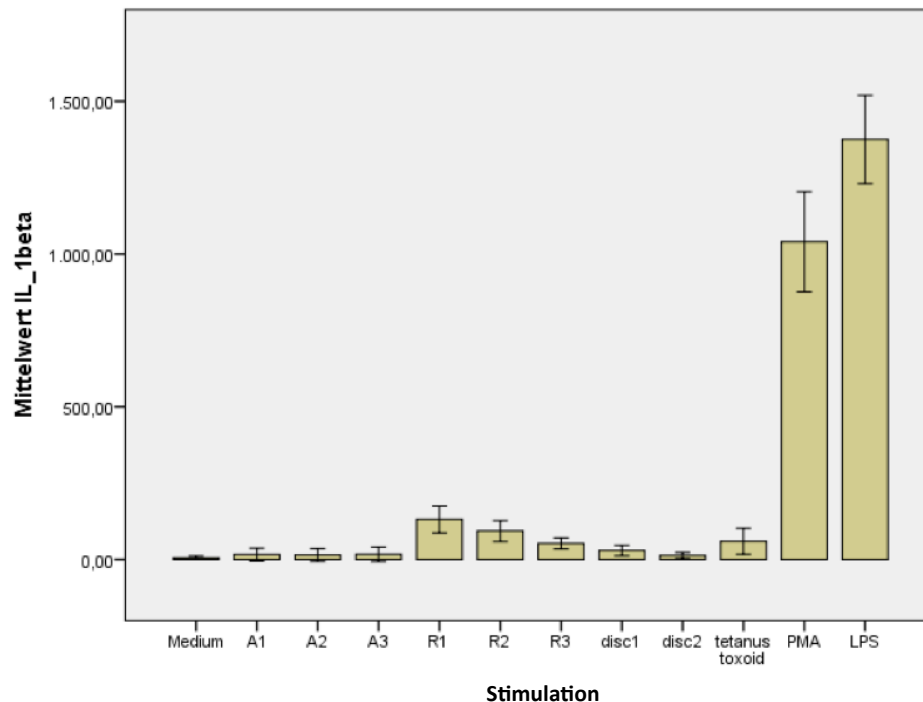


Abbildung 8: IL-1beta Mittelwerte bei den unterschiedlichen Stimulantien (A= Anatase-Partikel; R= Rutil-Partikel; disc= Titanplättchen; tetanus toxoid, PMA=Phorbol-12-Myristat-13-Acetat, LPS= Lipopolysaccharid, jeweils als Kontroll-Stimulus)

In der Abb.8 sind die Mittelwerte (pg/ml) von IL-1beta im Zellkulturüberstand auf die unterschiedlichen Stimulantien dargestellt, man erkennt die deutlich höheren IL-1beta-Werte auf das Stimulans Rutil im Vergleich zu Anatase.

Im Anhang unter 6.1. sind die einzelnen Vergleiche zwischen den Partikeln in Tabellen dargestellt mit dem jeweiligen P-Wert, dem Mittelwert und den Standardabweichungen. Man konnte zwischen folgenden Stimulanzen signifikante Unterschiede ($P < 0,05$) in den IL-1beta-Werten feststellen:

- Anatase 1 und Rutil 1
- Anatase 2 und Rutil 2
- Anatase 3 und Rutil 3
- Rutil 1 und Disc 1
- Rutil 1 und Disc 2
- Rutil 2 und Disc 1
- Rutil 2 und Disc 2
- Rutil 3 und Disc 2

Die IL-1beta Werte sind signifikant höher bei den TiO₂-Rutil-Partikeln sowohl im

Ergebnisse

Vergleich zu den TiO₂-Anatase-Partikeln als auch im Vergleich zu den Titanplättchen (Disc). Dieser signifikante Unterschied zeigt sich sowohl bei den höheren Konzentrationen (Rutil 1, Anatase 1 = $1 \times 10^{-4} \text{M}$) als auch bei den mittleren (Rutil 2, Anatase 2 = 5×10^{-5}) und den niedrigeren Konzentrationen (Rutil 3, Anatase 3 = 1×10^{-5})

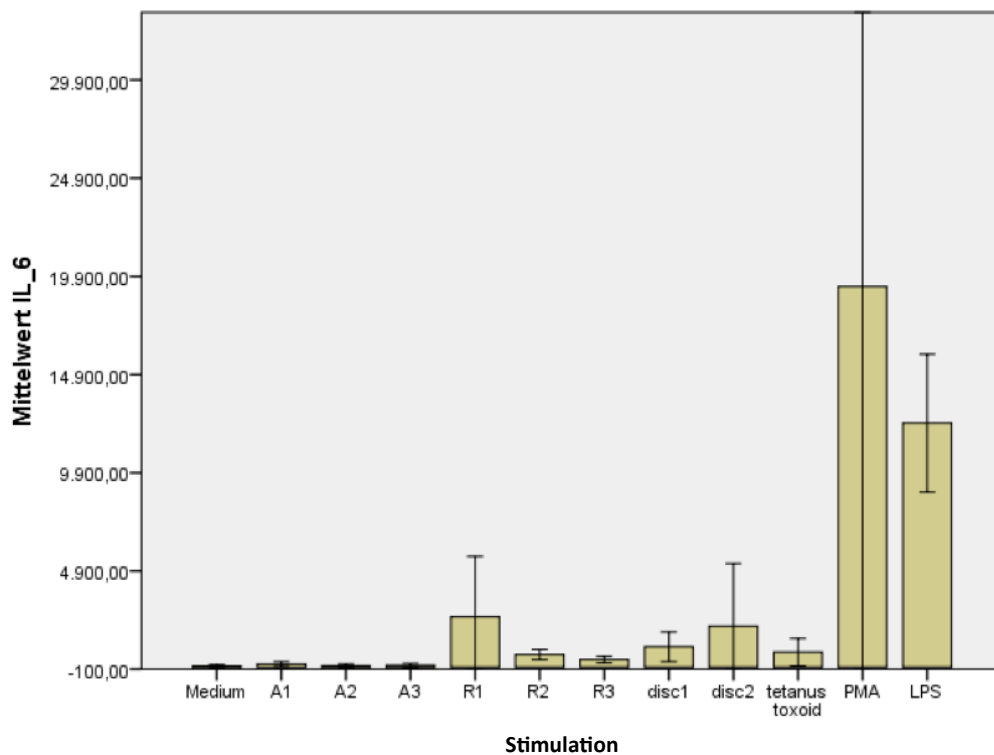


Abbildung 9: IL-6 Mittelwerte bei den unterschiedlichen Stimulantien; Abkürzungen siehe Legende zu Abb. 8

In Abb.9 sind die Mittelwerte (pg/ml) von IL-6 im Zellkulturüberstand auf die unterschiedlichen Stimulantien dargestellt. Im T-Test bei unabhängigen Stichproben konnten zwischen folgenden Stimulanzen signifikante Unterschiede ($P < 0,05$) festgestellt werden:

- Anatase 2 und Rutil 2
- Anatase 3 und Rutil 3
- Anatase 1 und Disc 1
- Anatase 2 und Disc 1
- Anatase 3 und Disc 1

Die Tabellen mit den jeweiligen P-Werten und den exakten Mittelwerten und Standardabweichungen sind im Anhang unter 6.1. zu finden.

Ergebnisse

Die IL-6 Werte sind bei den TiO₂-Rutil-Partikeln signifikant höher im Vergleich zu den TiO₂-Anatase-Partikeln. Dies sowohl bei der mittleren als auch bei der niedrigeren Konzentration. Zudem sind die IL-6 Werte bei den „Straumann-Titanplättchen“ signifikant höher als bei den TiO₂-Anatase-Partikeln. Auch hier bei allen 3 Konzentrationen.

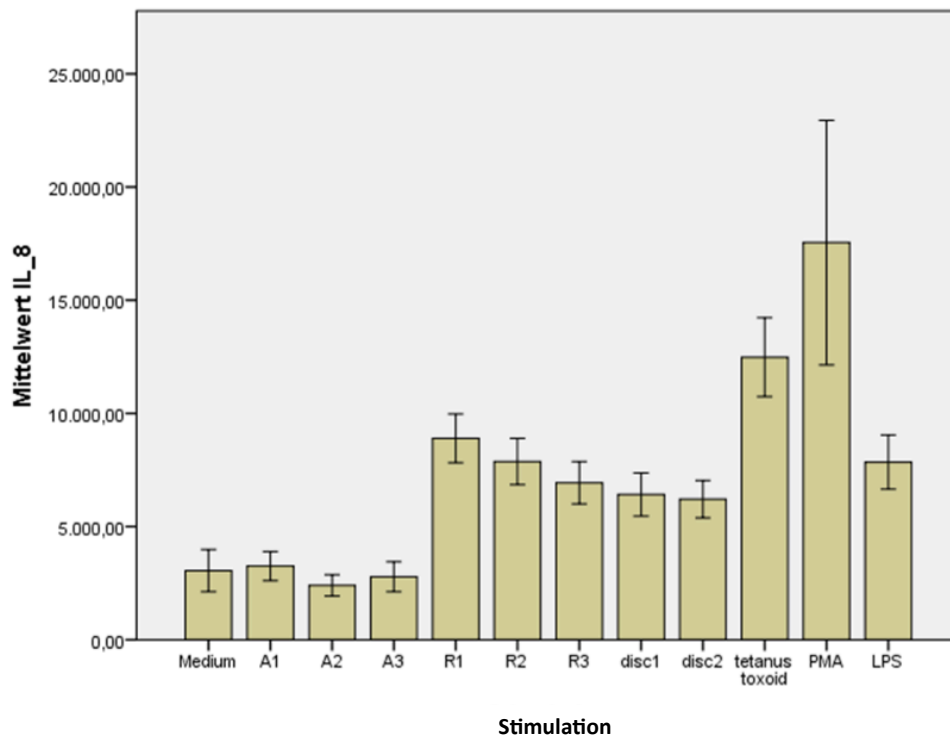


Abbildung 10: IL-8 Mittelwerte bei den unterschiedlichen Stimulantien; Abkürzungen siehe Legende zu Abb. 8

In Abb.10 sind die Mittelwerte (pg/ml) von IL-8 im Zellkulturüberstand bei den unterschiedlichen Stimulantien dargestellt. Auch hier wurde der T-Test bei unabhängigen Stichproben angewendet und zwischen folgenden Stimulanzen waren signifikante Unterschiede ($P < 0,05$) in der IL-8 Produktion festzustellen:

- Anatase 1 und Rutil 1
- Anatase 2 und Rutil 2
- Anatase 3 und Rutil 3
- Anatase 3 und Disc 1
- Anatase 3 und Disc 2
- Anatase 2 und Disc 1
- Anatase 2 und Disc 2
- Anatase 1 und Disc 1
- Anatase 1 und Disc 2

Ergebnisse

- Rutil 1 und Disc 1
- Rutil 1 und Disc 2
- Rutil 2 und Disc 1
- Rutil 2 und Disc 2

Im Anhang unter 6.1. sind die Tabellen mit den jeweiligen P-Werten, Mittelwerten und Standardabweichungen zu finden.

Die IL-8 Werte sind bei den TiO₂-Rutil-Partikeln signifikant höher als bei den TiO₂-Anatase-Partikeln. Dies betrifft alle Konzentrationen, von niedrig über mittel bis hoch. Die IL-8 Werte bei den Titanplättchen sowohl von Fa. Straumann als auch von Fa. Dentsply sind im Vergleich zu denen bei TiO₂-Anatase-Partikeln signifikant höher, auch hier wieder alle 3 Anatase-Konzentrationen betreffend. Beim Vergleich der IL-8 Werte zwischen TiO₂-Rutil-Partikeln und Titanplättchen konnten auch wieder signifikant höhere Werte zugunsten der TiO₂-Rutil-Partikel festgestellt werden, hier bei den höheren und mittleren Konzentrationen.

4.2 Zusammenhang zwischen Genotyp und Komplikationen

Die zweite Zielsetzung dieser Arbeit war, festzustellen ob ein bestimmter Genotyp häufiger in einer der beiden Patientengruppen, mit und ohne Komplikationen, vorzufinden ist. Von den 136 Patienten waren 24 als komplikationsbehaftet beschrieben. Als Komplikationen waren von den untersuchenden Ärzten 13-mal Mucositis, 7-mal Periimplantitis und 4-mal „BOP“ (bleeding on probing) angegeben worden. Bei 112 war der Zahnimplantat-Status als unauffällig eingestuft worden. Da für alle Patienten ein „Genotyp-Muster“ über einen kommerziellen Test erstellt worden war, waren vergleichbare Auflistungen möglich.

Tabelle 4: Komplikationen

	Mit Komplikationen (N)	Ohne Komplikationen (N)	Mit Komplikationen (%)	ohne Komplikationen (%)
Männer	9	49	15,5%	84,5%
Frauen	15	63	19,2%	80,8%
insgesamt	24	112	17,6%	82,4%

Daraufhin wurden folgende Graphen im Excel-Programm erstellt:

Ergebnisse

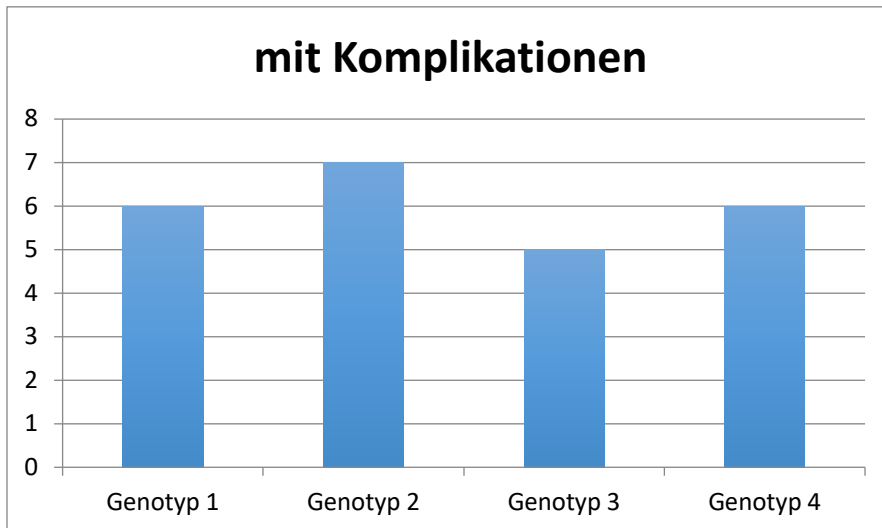


Abbildung 11: Genotyp Verteilung bei den 24 Patienten mit Komplikationen

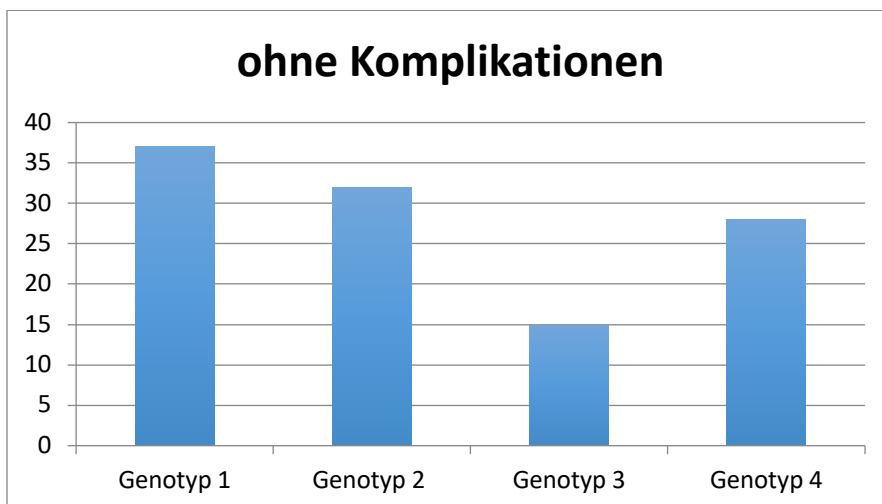


Abbildung 12: Genotyp Verteilung bei den 112 Patienten ohne Komplikationen

In Abb.11 wird sichtbar, dass sich unter den Patienten mit Komplikationen kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Genotypen herausstellt. In Abb.12 zeigt sich dasselbe für die Patienten ohne Komplikationen, auch hier ist die Verteilung nicht signifikant. Tabelle 5 gibt nochmal die genauen Zahlen der Verteilung der Genotypen innerhalb der 2 Gruppen, mit und ohne Komplikation, wieder. Zudem ist die Prozentzahl mit angegeben.

Tabelle 5: Genotyp Verteilung; mit und ohne Komplikationen

	Genotyp 1	Genotyp 2	Genotyp 3	Genotyp 4
N	43	39	20	34
N (%)	31,62	28,68	14,71	25
N mit Komplikationen	6	7	5	6

Ergebnisse

N mit Komplikationen (%)	25	29,17	20,83	25
N ohne Komplikationen	37	32	15	28
N ohne Komplikationen (%)	32,74	28,57	13,39	25

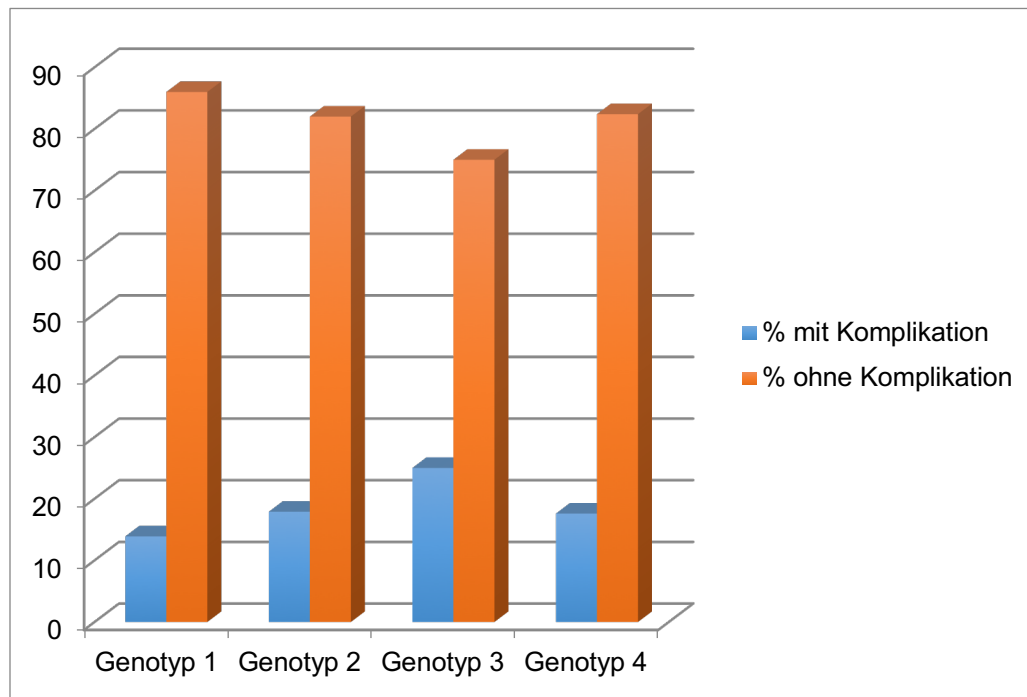


Abbildung 13: Verteilung der Komplikationen in Prozentangabe über die Genotypen

In Abbildung 13 sieht man die Verteilung der Komplikationen in Prozentangaben über die Genotypen. Es konnte auch hier kein signifikanter Unterschied in den Gruppen ermittelt werden, allerdings wird sichtbar, dass beim Genotyp 3, proportional zur Gesamtzahl an Patienten mit Genotyp 3, mehr Patienten in diesem Fall Komplikationen hatten im Vergleich zu den anderen Genotypen.

Wir konnten anhand der von der Fa. Bioscentia übermittelten Werte, nachvollziehen, ob bei den verschiedenen Genen das Allel 1 oder 2 vorliegt und ob diese heterozygot oder homozygot vorliegen. Beim Allel 1 handelt es sich um die Ursprungsform, beim Allel 2 um eine veränderte Form. Daran haben wir die Definition der Genotyp Kategorien, wie sie von der Fa. Bioscentia vorgegeben wird, nachvollziehen können. Folgendes kam heraus:

Ergebnisse

Tabelle 6: Hauptgene mit dazugehörigen Genloci über die Genotyp Gruppen verteilt

	Genotyp 1 (43 Patienten)	Genotyp 2 (39 Patienten)	Genotyp 3 (20 Patienten)	Genotyp 4 (34 Patienten)
Interleukin 1A Allel 1 (-C889)	41	29	17	34
Interleukin 1A Allel 2 (-889T)	8	37	19	4
Interleukin 1B Allel 1 (-C3953)	43	33	17	34
Interleukin 1B Allel 2 (+3953T)	5	37	18	2
Interleukin 1RN Allel 1 (+T2018)	42	39	16	24
Interleukin 1RN Allel 2 (+2018C)	2	2	19	34

Man sieht, dass generell die homozygote Form deutlich seltener vorkommt als die heterozygote Form des Allel 2.

Beim Genotyp 1 liegt für keines der 3 Gene das Allel 2 vor, nur in einigen Ausnahmefällen bei einzelnen Genen, aber nie in Kombination.

Beim Genotyp 2 tritt sowohl beim Interleukin 1A als auch beim Interleukin 1B das Allel 2 auf, jedoch nicht beim Interleukin 1RN. Es handelt sich bei diesem Typ um den in der Literatur häufig genannten Kombinationsgenotyp positiv.

Beim Genotyp 3 kommt zusätzlich beim Interleukin 1RN das Allel 2 in allen Fällen vor. Die 3 Gene liegen hier in der Allel 2 Form dar, weshalb man beim Vorhandensein dieses Genotyps auch von einem sehr starken Risiko der Parodontitis ausgehen kann. Beim Genotyp 4 liegen die Gene Interleukin 1A und 1B selten in der Allel 2 Form dar. Dagegen ist das Interleukin 1RN immer Allel 2 positiv, weshalb man hier von einer verminderten Entzündungshemmung spricht.

4.3 Zusammenhang zwischen Genotyp und IL-1beta-Produktion

Eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit bestand darin, den Zusammenhang zwischen den Genotypen der Patienten und deren IL-1beta Produktion in vitro zu überprüfen. Zusätzlich wurde hier noch zwischen den Komplikationen unterschieden. Angewendet zur Datenbewertung wurde der 2way ANOVA Test und der Bonferroni Posttest mithilfe des Programmes GraphPad Prism.

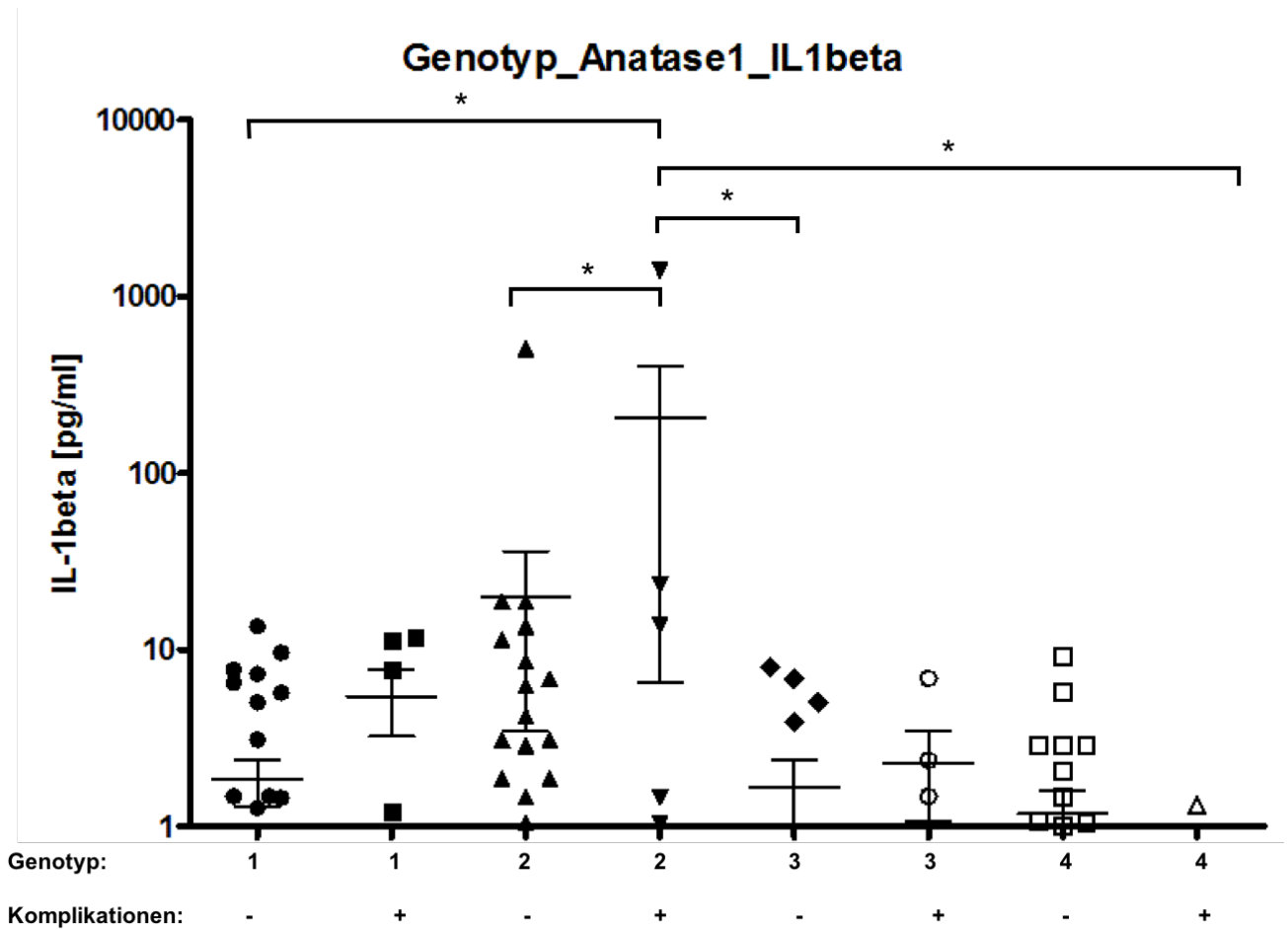


Abbildung 14: IL-1beta Werte bei der Stimulation mit Anatase 1 unterteilt nach Genotyp und Komplikation

Tabelle 7: IL-1beta Mittelwerte bei den Genotypen 1-, 2+, 4+, 3-, 2- durch die Stimulation mit Anatase

Genotyp 1-	1,834
Genotyp 2+	205,5
Genotyp 4+	1,183
Genotyp 3-	1,694
Genotyp 2-	19,87

Man kann anhand der Abbildung 14 erkennen, dass bei der Stimulation mit Anatase 1 die IL-1beta Werte statistisch signifikant höher beim Genotyp 2 mit Komplikationen sind, sowohl im Vergleich mit dem Genotyp 2 ohne Komplikationen, dem Genotyp 3 ohne Komplikationen, dem Genotyp 1 ohne Komplikationen als auch dem Genotyp 4 mit Komplikationen. Bei diesen Genotypen sind die IL-1beta Mittelwerte signifikant niedriger im Vergleich zum Genotyp 2 mit Komplikationen.

Die Tab. 7 zeigt die IL-1beta Mittelwerte bei den unterschiedlichen Genotypen.

Es muss allerdings angemerkt werden, dass speziell zu den Testansätzen bezüglich „Genotyp 2+“-Patienten, eine kleine Fallzahl und hohe Standard-Abweichung vorlag.

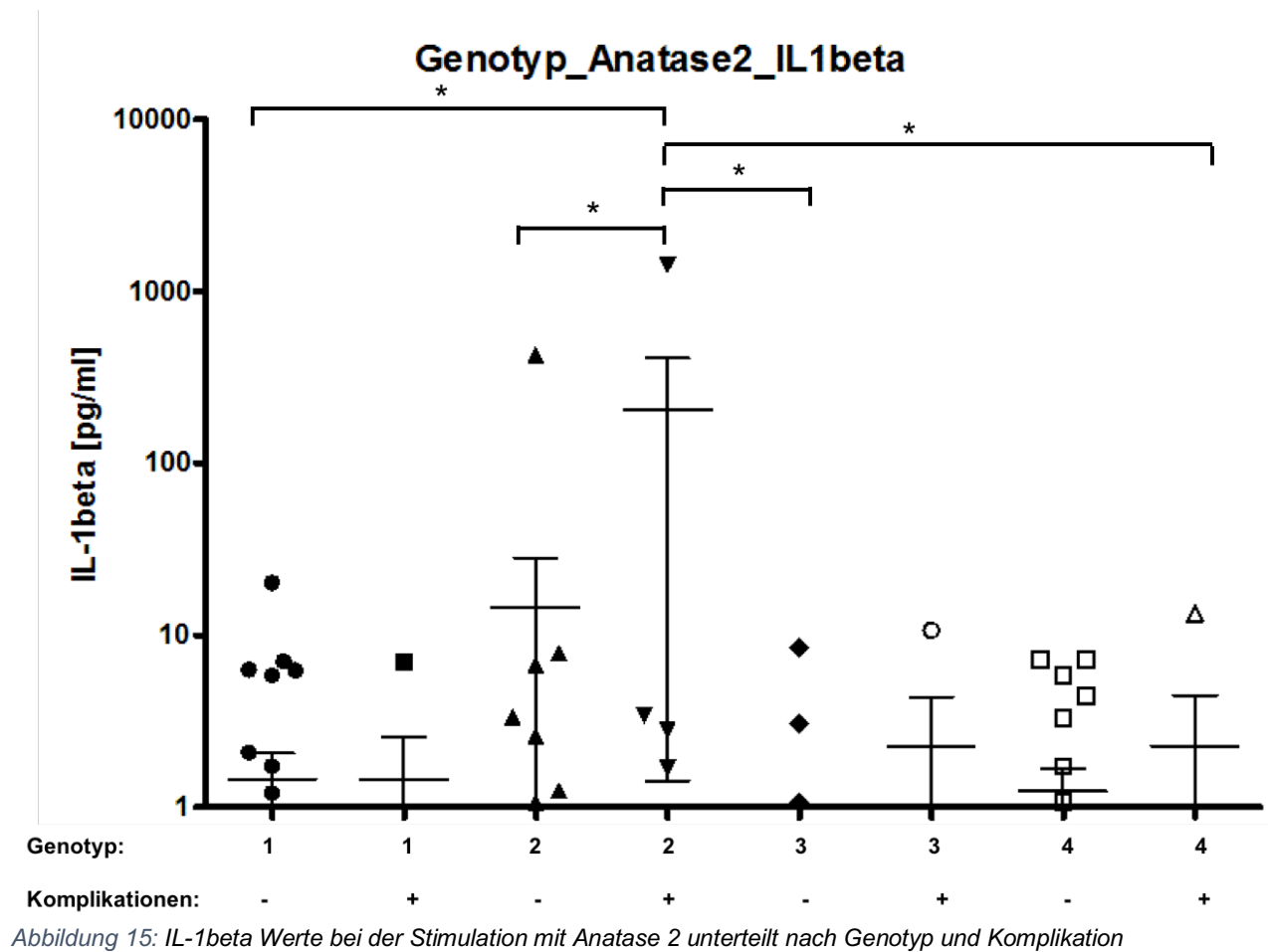


Tabelle 8: IL-1beta Mittelwerte bei den Genotypen 1-, 2+, 4+, 3-, 2- durch die Stimulation mit Anatase 2

Genotyp 1-	1,452
Genotyp 2+	205,1
Genotyp 4+	1,234
Genotyp 3-	0,917
Genotyp 2-	14,58

Anhand der Abbildung 15 erkennt man, dass auch bei der Stimulation mit Anatase 2 die IL-1beta Werte statistisch signifikant höher beim Genotyp 2 mit Komplikationen sind, sowohl im Vergleich mit dem Genotyp 2 ohne Komplikationen, dem Genotyp 3 ohne Komplikationen, dem Genotyp 1 ohne Komplikationen als auch dem Genotyp 4 mit Komplikationen. Bei diesen Genotypen sind die IL-1beta Mittelwerte signifikant niedriger im Vergleich zum Genotyp 2 mit Komplikationen.

Die Tab. 8 gibt zudem die Mittelwerte bei den unterschiedlichen Genotypen wieder. Auch hier muss wieder angemerkt werden, dass speziell zu den Testansätzen bezüglich „Genotyp 2+“-Patienten eine kleine Fallzahl und hohe Standard-Abweichung vorlag.

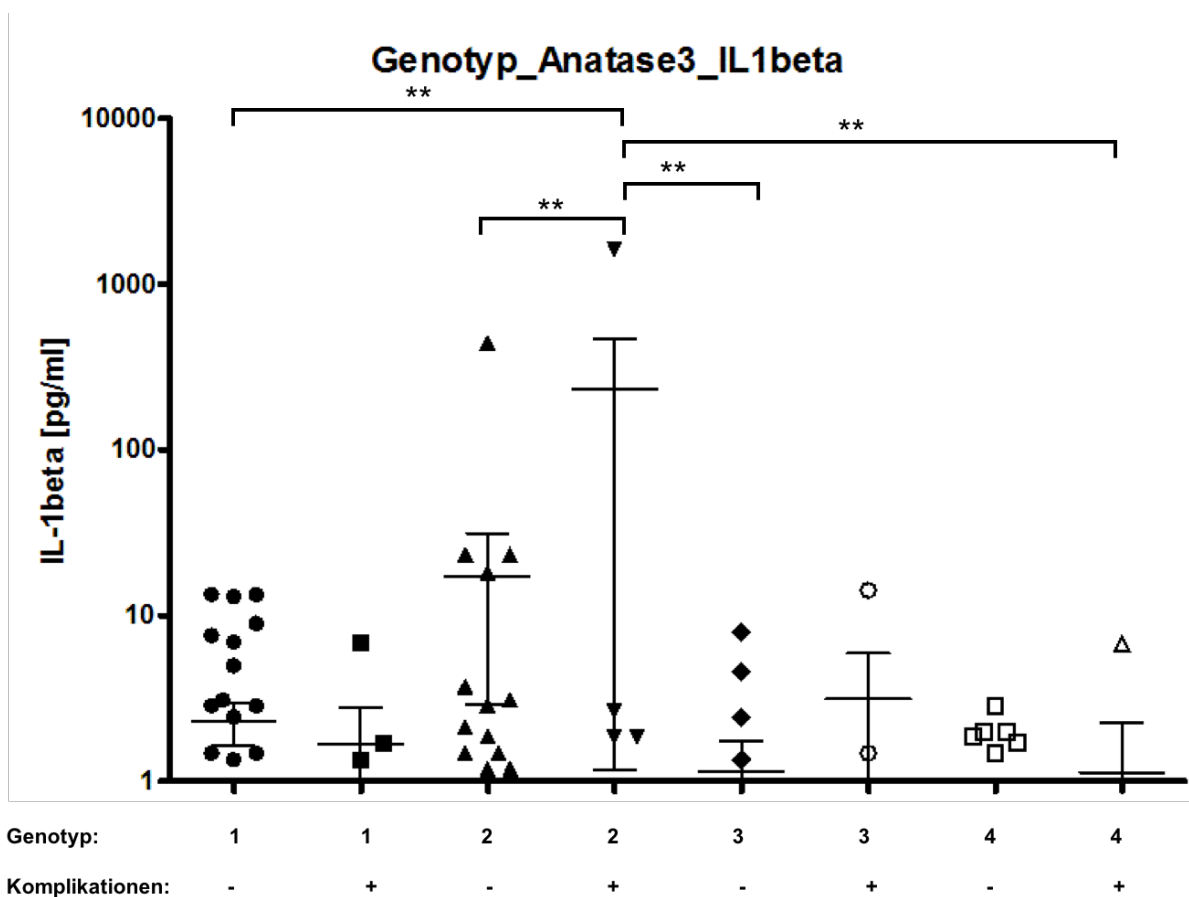


Abbildung 16: IL-1beta Werte bei der Stimulation mit Anatase3 unterteilt nach Genotyp und Komplikation

Tabelle 9: IL-1beta Mittelwerte bei den Genotypen 1-, 2+, 4+, 3-, 2- durch die Stimulation mit Anatase 3

Genotyp 1-	2,308
Genotyp 2+	233,8
Genotyp 4+	0,536
Genotyp 3-	1,155
Genotyp 2-	17,13

Ergebnisse

Anhand der Abbildung 16, erkennt man ein weiteres Mal dass, wie bei den vorherigen Stimulanzen, Anatase 1 und 2, auch bei der Stimulation mit Anatase 3 die IL-1beta Werte statistisch signifikant höher beim Genotyp 2 mit Komplikationen sind. Auch hier wieder im Vergleich mit dem Genotyp 2 ohne Komplikationen, dem Genotyp 3 ohne Komplikationen, dem Genotyp 1 ohne Komplikationen als auch dem Genotyp 4 mit Komplikationen. Bei diesen Genotypen sind die IL-1beta Mittelwerte signifikant niedriger im Vergleich zum Genotyp 2 mit Komplikationen.

Tab.9 zeigt die Mittelwerte bei den unterschiedlichen Genotypen.

Es sei wieder auf die kleine Fallzahl und hohe Standardabweichung bei den „Genotyp 2+“-Patienten hingewiesen.

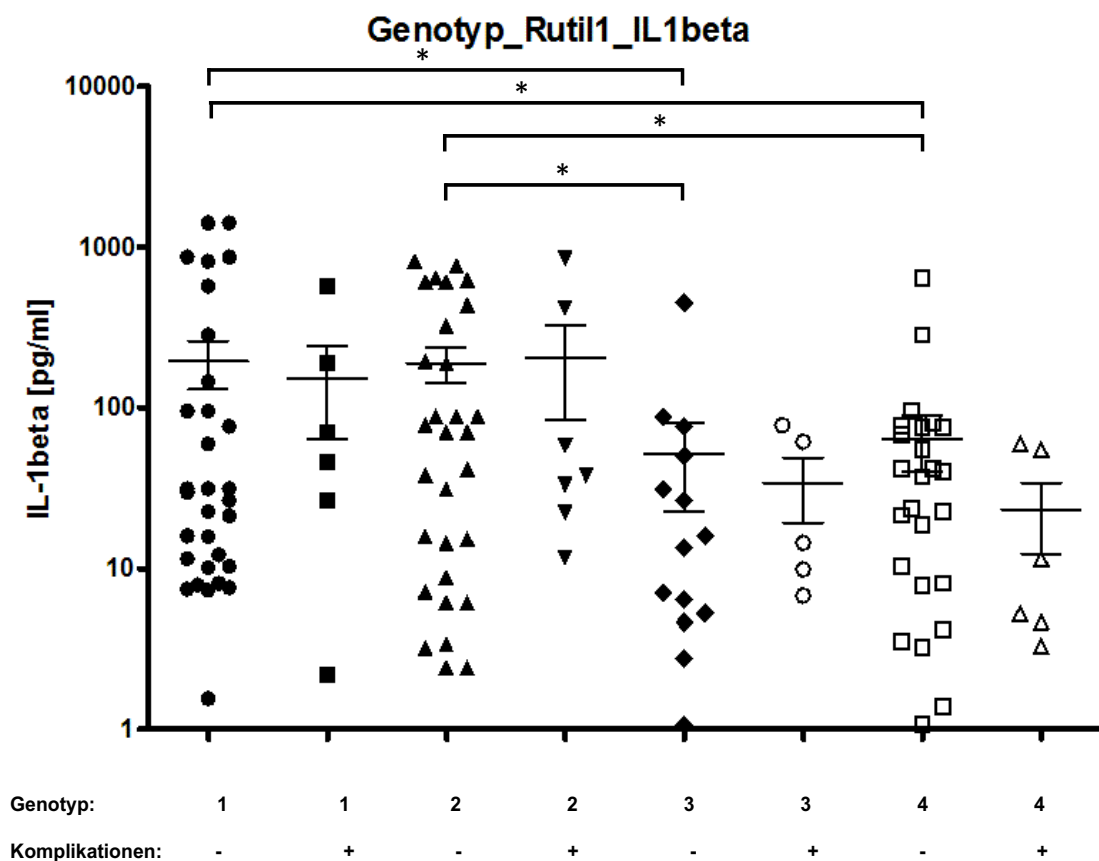


Abbildung 17: IL-1beta Werte bei der Stimulation mit Rutil 1 unterteilt nach Genotyp und Komplikation

Tabelle 10: IL-1beta Mittelwerte bei den Genotypen 1-, 4-, 3-, 2- durch die Stimulation mit Rutil 1

Genotyp 1-	195,2
Genotyp 4-	64,61
Genotyp 3-	51,97
Genotyp 2-	190

Ergebnisse

Die Abbildung 17 lässt erkennen, dass bei der Stimulation mit Rutil 1 die IL-1beta Werte statistisch signifikant höher beim Genotyp 1 ohne Komplikation im Vergleich zu den Genotypen 3 und 4 ohne Komplikationen sind. Zudem sind die IL-1beta Werte beim Genotyp 2 ohne Komplikation statistisch signifikant höher als bei den Genotypen 3 und 4 ohne Komplikationen. Die beiden Genotypen 1 und 2 zeigen demnach viel höhere IL-1beta Mittelwerte auf als die Genpotypen 3 und 4. Die Tab.10 zeigt die unterschiedlichen IL-1beta Mittelwerte bei der Stimulation mit Rutil 1.

4.4 Einfluss der Bakterien auf die Werte der Interleukine

Die vierte Zielsetzung dieser Arbeit war es nach einem Zusammenhang zwischen den im Mundhöhlenabstrich gefundenen Bakterien und den Interleukin-Werten der In-vitro-Stimulationen zu suchen. Mithilfe des Kruskal-Wallis-Test im Programm SPSS wurde für jedes Zytokin nach signifikanten Unterschieden in den Kategorien der Keimkonzentrationen gesucht. Die Nullhypothese dieses Testes besagt, dass die Verteilung der Interleukine über die Kategorien der Keimkonzentrationen identisch ist. Im Anhang unter 6.2. ist die Tabelle mit den P-Werten dieses Tests aufgeführt. Aufgrund der Fallzahlen (s.Tab.11) wurde dieser Test für alle Bakterien ausser Aa, Pi und En durchgeführt, da hier die Zahlen bei der „Keimkonzentration unter der Nachweisgrenze“ zu hoch sind und demnach die Aussagekraft zu gering wäre. Daraufhin wurde mit diesen Ergebnissen im Programm GraphPad Prism der 2way ANOVA Test und der Bonferroni Posttest angewendet, um genau zu erfahren, wo die signifikanten Ergebnisse zu finden sind.

Tabelle 11: Fallzahlen der Keimkonzentrationen bei 136 Patienten (Aa = *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*, Pg = *Porphyromonas gingivalis*, Tf = *Tannerella forsythia*, Td = *Treponema denticola*, Pi = *Prevotella intermedia*, Pm = *Parvimonas micra*, Fn = *Fusobacterium nucleatum*, Cr = *Campylobacter rectus*, En = *Eubacterium nodatum*, Ec = *Eikenella corrodens*, Cg = *Capnocytophaga gingivalis*)

	Keimkonzentration unter der Nachweisgrenze	Keimkonzentration an der Nachweisgrenze	Keimkonzentration erhöht	Keimkonzentration stark erhöht	Keimkonzentration sehr stark erhöht
Aa	126	4	1	0	5
Pg	87	13	9	10	17
Tf	56	6	22	21	31
Td	88	5	23	10	10
Pi	111	8	4	5	8
Pm	52	5	38	27	14
Fn	25	0	26	30	55
Cr	70	7	37	17	5
En	120	12	2	1	1
Ec	63	11	48	12	2
Cg	72	8	31	16	9

Es wurde also untersucht, ob in Abhängigkeit von den unterschiedlichen „Vor-Ort“-Keimspektren, auch eine unterschiedliche Reaktion der zirkulierenden Blutzellen („PBMC“) auf Titanpartikel in vitro stattfinden würde. Hintergedanke war, ob bei bestimmter Keimbelastung am Titanimplantat eine „immunologische Auseinandersetzung“ mit Titanmaterialien getriggert wird - und, ob sich diese Auseinandersetzung im Sinne einer möglichen Sensibilisierung, auch bei zirkulierenden PBMC erkennen lässt. Im Folgenden sind die auffälligen Ergebnisse zu *Parvimonas micra* (Pm) gezeigt.

Ergebnisse

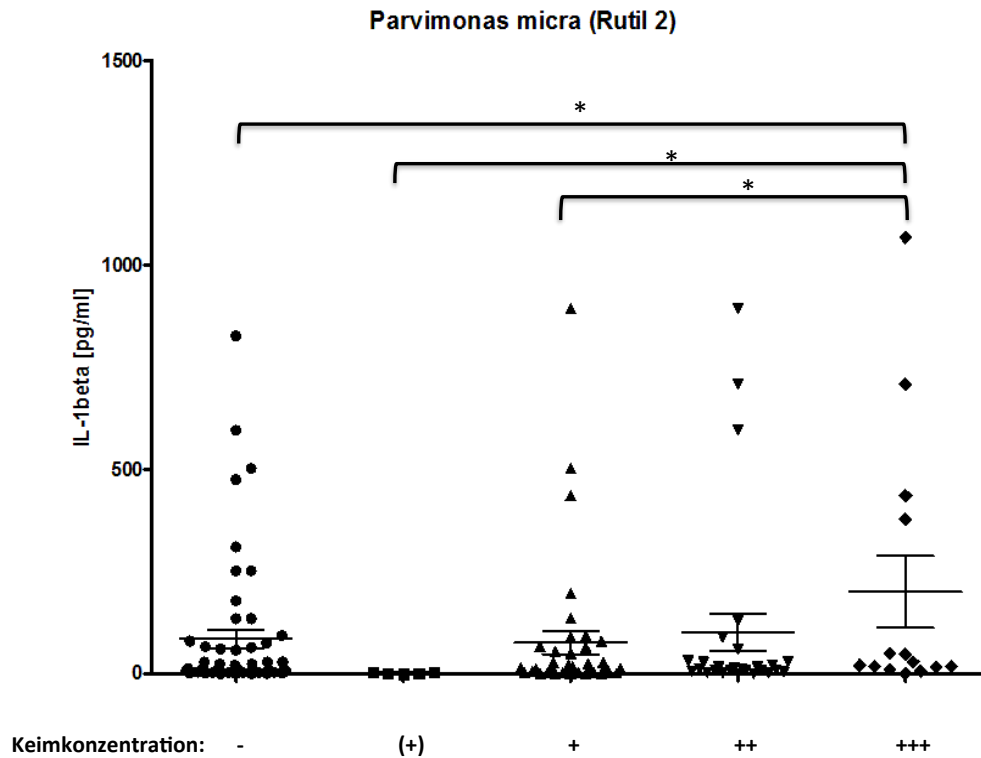


Abbildung 18: IL-1beta Werte unter der In-vitro-Stimulation von Rutil 2 bei Patienten mit den unterschiedlichen Konzentrationen vom Bakterium Pm

Abb. 18 zeigt die Werte von IL-1beta über die Kategorien der Keimkonzentration des Keimes *Parvimonas micra* (Pm) verteilt, bei der Stimulation der Zellen mit TiO₂-Rutil2-Partikeln. Es bestehen signifikante Unterschiede zwischen den Kategorien:

- „Keimkonzentration unter der Nachweisgrenze, -“ und „Keimkonzentration sehr stark erhöht, +++“
- „Keimkonzentration an der Nachweisgrenze, (+)“ und „Keimkonzentration sehr stark erhöht, +++“
- „Keimkonzentration erhöht, +“ und „Keimkonzentration sehr stark erhöht, +++“

Die Interleukinwerte sind im Fall eines sehr stark erhöhten *Parvimonas micra* Nachweises am Implantat signifikant höher als in den anderen Fällen.

Ergebnisse

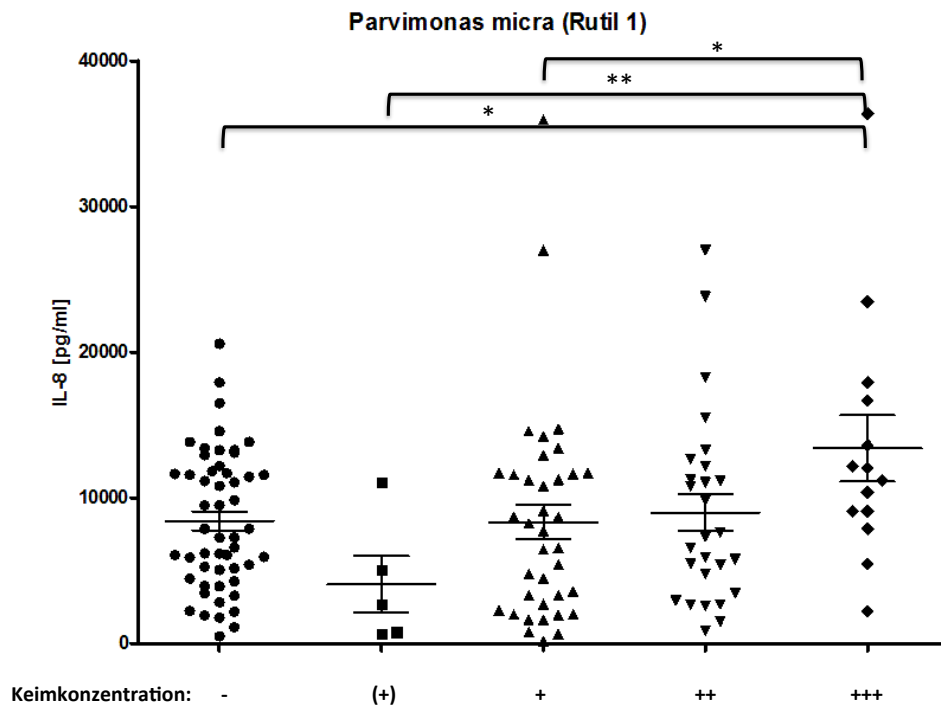


Abbildung 19: IL-8 Werte unter der In-vitro-Stimulation von Rutil 1 bei Patienten mit den unterschiedlichen Konzentrationen vom Bakterium Pm

Abb. 19 zeigt die Werte von IL-8 über die Kategorien der Keimkonzentration des Keimes *Parvimonas micra* (Pm) verteilt, bei der Stimulation der Zellen mit TiO₂-Rutil1-Partikeln. Es bestehen signifikante Unterschiede zwischen den Kategorien:

- „Keimkonzentration unter der Nachweisgrenze, -“ und „Keimkonzentration sehr stark erhöht, +++“
- „Keimkonzentration an der Nachweisgrenze, (+)“ und „Keimkonzentration sehr stark erhöht, +++“
- „Keimkonzentration erhöht, +“ und „Keimkonzentration sehr stark erhöht, +++“

Auch die Interleukinwerte von IL-8 sind im Fall einer sehr stark erhöhten Konzentration an *Parvimonas micra* Nachweises am Implantat signifikant erhöht.

Ergebnisse

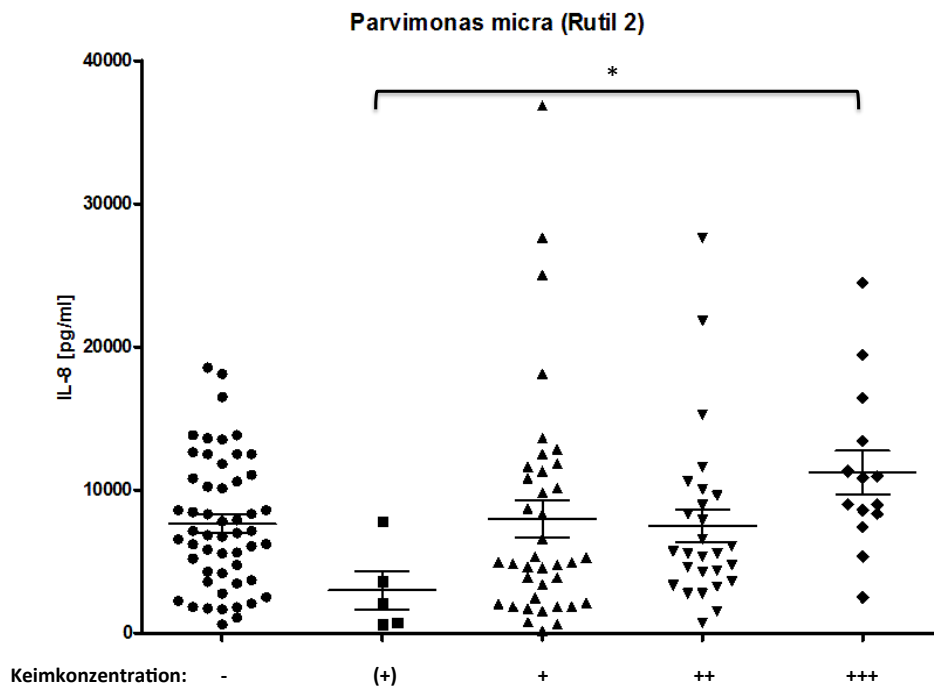


Abbildung 20: IL-8 Werte unter der Stimulation von Rutil 2 bei Patienten mit den unterschiedlichen Konzentrationen vom Bakterium Pm

Abb. 20 zeigt die Werte von IL-8 über die Kategorien der Keimkonzentration des Keimes *Parvimonas micra* (Pm) verteilt, bei der Stimulation der Zellen mit TiO_2 -Rutil2-Partikeln. Es bestehen signifikante Unterschiede zwischen den Kategorien:

- „Keimkonzentration an der Nachweisgrenze, (+)“ und „Keimkonzentration sehr stark erhöht, +++“

Hier sind die Interleukin 8 Werte auch signifikant höher, wenn der *Parvimonas micra* Nachweis am Implantat in sehr stark erhöhter Konzentration vorliegt, im Vergleich zum *Parvimonas micra* an der Nachweisgrenze.

Ergebnisse

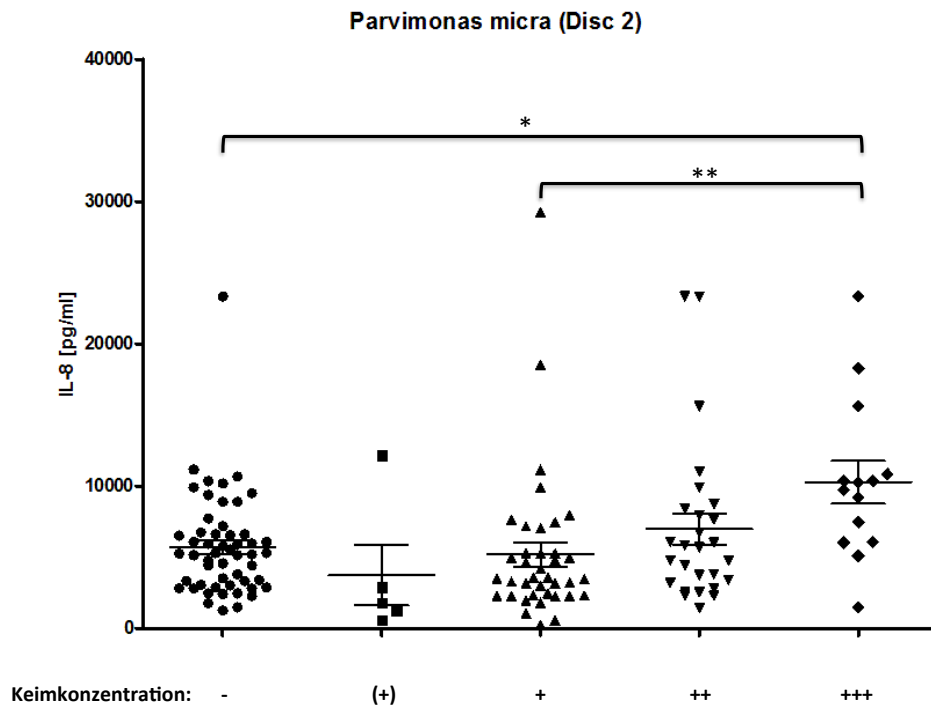


Abbildung 21: IL-8 Werte unter der Stimulation von Disc 2 bei Patienten mit den unterschiedlichen Keimkonzentrationen vom Bakterium Pm

Abb. 21 zeigt die Werte von IL-8 über die Kategorien der Keimkonzentration des Keimes *Parvimonas micra* (Pm) verteilt, bei der Stimulation der Zellen mit Titanplättchen der Firma Dentsply. Es bestehen signifikante Unterschiede zwischen den Kategorien:

- „Keimkonzentration unter der Nachweisgrenze, -“ und „Keimkonzentration sehr stark erhöht, +++“
- „Keimkonzentration erhöht, +“ und Keimkonzentration sehr stark erhöht, +++“

In diesem Fall sind wieder die Interleukin-Werte von IL-8 signifikant höher wenn der *Parvimonas micra* Nachweis am Implantat in einer sehr stark erhöhten Konzentration vorliegt, im Vergleich zu den Gruppen „*Parvimonas micra* unter der Nachweisgrenze“ und „*Parvimonas micra* erhöht“.

Ergebnisse

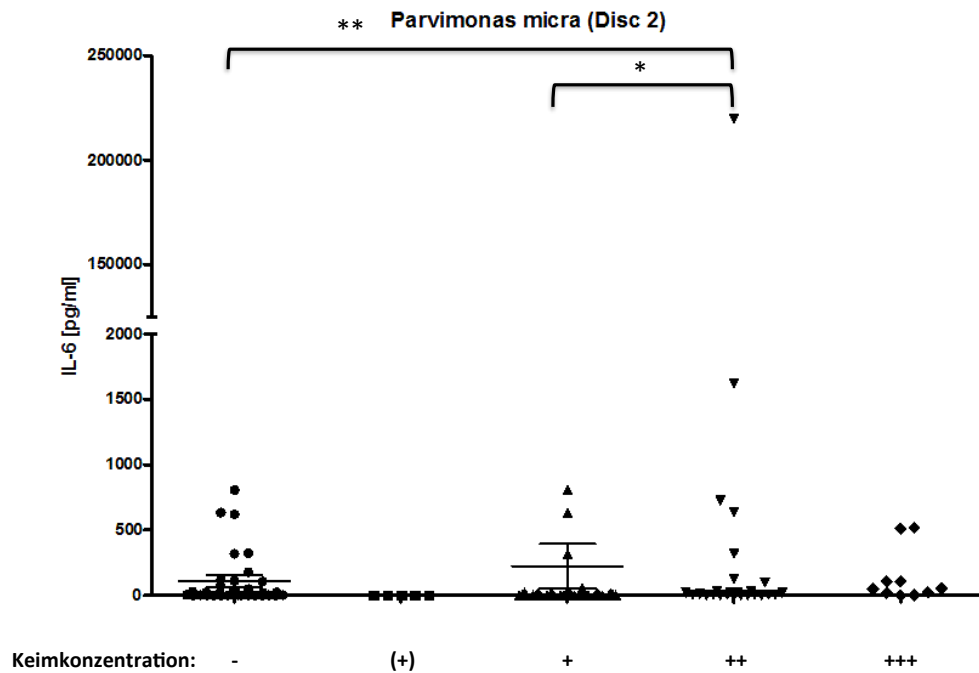


Abbildung 22: IL-6 Werte unter der Stimulation von Disc 2 bei Patienten mit den unterschiedlichen Keimkonzentrationen vom Bakterium Pm

Abb. 22 zeigt die Werte von IL-6 über die Kategorien der Keimkonzentration des Keimes *Parvimonas micra* (Pm) verteilt, bei der Stimulation der Zellen mit Titanplättchen der Firma Dentsply. Es bestehen signifikante Unterschiede zwischen den Kategorien:

- „Keimkonzentration unter der Nachweisgrenze, -“ und „Keimkonzentration stark erhöht, +++“
- „Keimkonzentration erhöht, +“ und „Keimkonzentration stark erhöht, ++“

Die Interleukin 6 Produktion in vitro liegt bei *Parvimonas micra* Nachweisen am Implantat, sowohl in der Konzentration „unter der Nachweisgrenze“ als auch in der Konzentration „erhöht“, signifikant höher als bei der Konzentration „stark erhöht“. Es liegen hier, im Gegensatz zum IL-1beta und IL-8, niedrigere Interleukin-Werte (pg/ml) vor, wenn das Bakterium in höherer Konzentration am Implantat vorliegt.

5 Diskussion

5.1 Vergleich TiO_2 -Rutil-Partikel mit TiO_2 -Anatase-Partikel und Titanplättchen

Bei dem Vergleich der PBMC-Reaktionen in vitro auf die unterschiedlichen Titanpartikel, zeigt sich, dass die Interleukin-Werte von den TiO_2 -Rutil-Partikeln über die Titanplättchen bis hin zu den TiO_2 -Anatase-Partikeln „abnehmen“. Kleine Partikel schienen somit eher zu Reaktionen zu führen. Man spricht in Bezug auf die Nanopartikel zum einen von der Genotoxizität und zum anderen von der Fähigkeit Entzündungen auslösen zu können.

Titandioxid (TiO_2) ist ein natürlich vorkommendes Oxid vom Titan. Es existieren mehrere unterschiedliche kristalline Strukturen vom TiO_2 wobei Rutil die natürlichste Form und Anatase eine eher seltene Form darstellt. TiO_2 wird viel im Bereich der Pigmente verwendet und verleiht weiße Farbe und Opazität in unterschiedlichen Gebieten und Materialien, wie in der Malerei, im Plastik, im Papier, im Essen und in der Zahnpasta. Auch in pharmazeutischen und kosmetischen Produkten wie Sonnencreme findet TiO_2 Anwendung aufgrund seiner photokatalytischen und antiproliferativen Eigenschaften [30, 31]. Somit ist praktisch jeder Mensch im täglichen Leben Titan-exponiert.

Nanopartikel kommen auch natürlich vor, unter anderem als biogenes Magnetit, welches in vielen Spezien vorkommt, von den Bakterien hin zu den Protozoen und zu den Tieren. Sogar im menschlichen Gehirn konnte biogenes Magnetit gefunden werden [32, 33]. Ein weiteres natürlich vorkommendes Nanopartikel findet man außerdem im Ferritin wieder, ein 12 nm langes Eisenspeicherprotein, sowie in der Natur durch Verbrennungsprozesse bei Waldbränden und in Vulkanen [34]. Neben den natürlich vorkommenden Nanopartikeln gibt es dann noch die beabsichtigten und unbeabsichtigten antropogen hergestellte Nanopartikel [35].

Bis vor kurzem war der Gebrauch von TiO_2 auf feine und grobe Partikel beschränkt, die einen Durchmesser von über 100nm aufwiesen. Diese Partikel wurden nach Untersuchungen als biologisch inert sowohl bei Menschen als auch bei Tieren eingestuft [36]. Wegen der einzigartigen Eigenschaften von kleinen Partikeln, werden neuerdings mehr und mehr Nanopartikel in medizinischen und kosmetischen Produkten angewendet [35].

Im Bereich der Medizin werden Nanopartikel vor allem für die Diagnose und die Therapie angewendet [37].

Allerdings muss aufgrund der geringen Größe die biologische Unbedenklichkeit neu hinterfragt werden. Nanopartikel haben eine extrem große Oberfläche pro Masseneinheit, weshalb an deren potenziell toxikologische Eigenschaften gedacht werden muss. Die geringe Größe und die damit verbundene große spezifische Oberfläche geben den Nanopartikeln spezielle Eigenschaften. Zu diesen Eigenschaften zählt unter anderem die Fähigkeit, als Katalysatoren in chemischen Reaktionen zu agieren. Das Verhältnis der Oberfläche zum Atom oder Molekül steigt exponentiell mit der sinkenden Partikelgröße. Die vergrößerte Oberfläche der Nanopartikel geht mit einer stärkeren biologischen Aktivität pro Masseneinheit einher, verglichen mit größeren Partikeln, wenn sie in einem lebenden Organismus

aufgenommen werden. Diese stärkere biologische Aktivität kann sowohl nützlich als auch unerwünscht sein. Zu den nützlichen Effekten zählen die antioxidativen Aktivitäten, die Trägerkapazität für Pharmazeutika, sowie die Penetration der Zellbarrieren in der Medikamentenverabreichung. Zu den negativen Effekten gehört die Toxizität, die Auslösung von oxidativem Stress und die zelluläre Dysfunktion. Erwünschte und unerwünschte Effekte können zudem parallel ablaufen. Desweiteren kann auch die Interaktion der Nanopartikel mit Zellen und subzellulären Substanzen sehr unterschiedlich zur Interaktion mit größeren Partikeln sein [35].

Das charakteristische biokinetische Verhalten der Nanopartikel zeigt vielversprechende Qualitäten für die diagnostische und therapeutische Medizin. Vor allem im Gebiet der Arzneistoffgabe in schwer zu erreichenden Geweben, sind die Nanopartikel hochinteressant [38]. Nichtsdestotrotz müssen alle erwünschten Effekte in Relation zu den unerwünschten gebracht werden, um eine Risiko-Nutzen-Abwägung zu erzielen.

Über die Genotoxizität von TiO_2 -Nanopartikel wird viel diskutiert. Eine Reihe an Tests wurden hierzu durchgeführt. Einige sind, was die Genotoxizität anbelangt, positiv ausgefallen, andere wiederum negativ. Der Grund der uneinheitlichen Ergebnisse könnte zum einen an den in den Tests ungleich verwendeten Materialien, wie etwa Größe, Form und Kristallstruktur liegen, und zum anderen an den unterschiedlich angewandten Testmethoden. Desweiteren haben die In-vitro-Tests mehr positive Ergebnisse geliefert als die In-vivo-Tests. DNA und Chromosom-Schäden konnten häufiger nachgewiesen werden als Genmutationen. Nahezu alle Tests für die Mutagenität sind negativ ausgefallen. Die Genotoxizität entsteht vor allem durch die Auslösung von oxidativem Stress. Dieser oxidative Stress, ausgelöst durch die Nanopartikel, könnte Einfluss auf die DNA Reparatur, den Zellzyklus, die Zellproliferation, sowie die Apoptose haben, indem es Proteinstrukturen angreift. Dieser entstandene oxidative Stress beruht vermutlich auf der großen spezifischen Oberfläche der Nanopartikel [39].

Die Genotoxizität ist auch höher, je kleiner die Nanopartikel sind. Die kleineren können leichter in die Zelle eintreten und im Inneren akkumulieren, sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern [40].

Eine proinflammatorische Wirkung von TiO_2 -Nanopartikel konnte nachgewiesen werden. Die Behandlung von gingivalen Fibroblasten mit TiO_2 -Nanopartikeln in Anwesenheit von IL-1 β führt zu einer Aggregation der Nanopartikel und zu einer Inkorporation dieser in die Zellen. Garcia-Contreras et al. zeigten, dass es in den Zellen durch das IL-1 β zu einer signifikant höheren Produktion von PGE₂ kommt und durch zusätzliche Anwesenheit von TiO_2 -Nanopartikel wird dies nochmals signifikant erhöht, egal ob IL-1 β bei den Zellen als Stimulus hinzukam, oder ob die TiO_2 -Nanopartikel allein als Stimulus bei den Zellen vorhanden waren. Auch die Expression von COX-1 und COX-2, welche durch IL-1 β stimuliert wird, nimmt signifikant zu wenn die TiO_2 -Nanopartikel hinzukommen. Anhand dieser Ergebnisse wird sichtbar dass TiO_2 -Nanopartikel proinflammatorisch wirken und zudem synergistisch zu IL-1 β fungieren [41].

Für Lungengewebe wurde gezeigt, dass kleinere TiO_2 -Partikel länger dort verweilen und eine viel größere Fraktion zu den regionalen Lymphknoten wandert. Dies zeigt,

dass kleinere Partikel nach einer alveolären Ablagerung leichter interstitielle Räume erreichen können. Anhand der Entzündungsreaktion konnte auch hier, nach der Exposition mit kleinen TiO_2 -Nanopartikeln, ein Anstieg der Zellzahl beobachtet werden. Dieser Anstieg konnte bei größeren Partikeln nicht beobachtet werden. Ebenso bestand eine lang anhaltende Entzündungsreaktion einige Zeit nach der Exposition mit kleinen Partikeln, die in der Form nicht bei größeren Partikeln zu sehen war. Die Daten zeigten also, verglichen mit feinen Partikeln, eine eindeutig größere pulmonale Entzündungsreaktion auf inhaled ultrafeine TiO_2 -Partikel. Außerdem wurde die größere interstitielle Translokation belegt [42].

Die Anatase-Partikel lösen in unseren Ergebnissen eine weniger starke Immunreaktion in vitro, verglichen mit den Titanplättchen, aus. Dass die Titanplättchen in vitro eine vergleichsweise stärkere Interleukin-Ausschüttung der PBMC verursachten, könnte theoretisch auf mehreren Faktoren beruhen. So könnte beispielsweise eine „LPS-Kontamination“ der Oberfläche bestehen. Allerdings hatten wir vor Verwendung der Plättchen eine Reinigung und Hitzebehandlung zur LPS-Entfernung durchgeführt. Kontrollversuche unter LPS-Zugabe (von uns hier nicht aufgelistet), hatten eine deutlich höhere Zytokinfreisetzung gezeigt. Meistens handelt es sich nicht um reines Titan - Bestandteile anderer Metalle sind vorzufinden, die verantwortlich für die stärkeren Reaktionen sein könnten. An der Implantatoberfläche konnte neben Titan und Sauerstoff zusätzlich Stickstoff (N), Kohlenstoff (C), Kalzium (Ca), Phosphor (P), Chlor (Cl), Natrium (Na), Schwefel (S) und Silicium (Si) nachgewiesen werden, wobei neben dem Titanoxid, Stickstoff und Kohlenstoff am dominantesten waren [43]. Die Herkunft dieser Kontaminationen können unterschiedlicher Natur sein. Während des Herstellungsprozesses, dem Sterilisationsprozedere oder in der Zeit der Lagerung, können Unreinheiten die Implantatoberfläche kontaminieren [44, 45]. Eine weitere Quelle der Kontamination besteht während des Setzens des Implantates, welche jedoch für unsere Ergebnisse irrelevant sind, da wir die Titanplättchen direkt von den Firmen bekommen haben und es sich nicht um bereits implantiertes Material handelte. Auch die Handhabung und Präparation der Plättchen während unserer Analysen, stellen eine mögliche Kontaminationsquelle dar. Allerdings waren die Rutil- und Anatase-Partikel derselben Prozedur hierbei ausgesetzt, weshalb auch diese Kontaminationsursache als nicht relevant anzusehen ist, wenn wir die Titanplättchen mit den TiO_2 -Partikeln vergleichen. Zudem war für alle Reagenzien „LPS-Freiheit“ angestrebt worden. Es konnte neben der oberflächlichen Oxidschicht auch eine Kontaminationszone nachgewiesen werden, bestehend aus Ca, Cl, S, P, Si und Na und einer Dicke von 0,3-1 nm [44]. Ein letzter Einflussfaktor könnte durch die Oberflächenrauheit der Plättchen auf anliegende Zellen erfolgt sein.

In einer weiteren Studie sah man neben der Titanoxidschicht einen großen Anteil an Kohlenstoff (C) als Kontamination. Auch hier konnte wieder eine Reihe von Elementen neben dem Titan gefunden werden. Es handelte sich in dieser Studie um Implantate bei denen die Osseointegration versagte, so dass man bei den Elementen Ca und Na eher davon ausging, diese seien aus Körperflüssigkeiten in der Zeit nach der Implantation gekommen. Si und P haben ihren Ursprung wahrscheinlich in den letzten Behandlungsschritten der Implantate, dem Sandstrahlen und dem elektrolytischen Oxydieren [46]. Ersteres, die Elemente Ca und Na, wären für unsere Studie wieder als nicht relevant einzustufen, da hier ein Tragen des Implantates vorausgesetzt wird. Allerdings könnte Si und P, vom Sandstrahlen stammend, auch in unseren Analysen vorhanden gewesen sein und so eine Erklärung für die stärkere Immunreaktion sein.

Desweiteren ist in unseren Ergebnissen, sowohl bei IL-1 als auch bei IL-8 zu erkennen, dass die signifikanten Unterschiede der Immunreaktion zwischen TiO₂-Rutil-Partikeln und Titanplättchen nur bei den 2 höheren Konzentrationen der TiO₂-Rutil-Partikel vorhanden sind. Sowohl bei einer Konzentration der TiO₂-Partikel von 1×10^{-4} M als auch 5×10^{-5} M, lösen diese eine stärkere Entzündungsreaktion aus, als die Titanplättchen. Dieser Unterschied ist so groß, dass er als signifikant eingestuft werden kann. Sobald eine bestimmte Konzentration unterschritten ist, nämlich bei einer Konzentration von nur mehr 1×10^{-5} M TiO₂-Partikel, besteht zwischen den TiO₂-Rutil-Partikeln und den Titanplättchen nur mehr ein Unterschied in der Immunreaktion der als nicht statistisch signifikant einzustufen ist. Dies belegt, dass die Konzentration und die Menge eine wichtige Rolle für die Stimulation der Immunreaktion in vitro spielen. Je höher die Konzentration, desto stärker ist die Immunreaktion. Neben der Partikelform, Partikelgröße und den chemischen Eigenschaften der Partikel, spielt auch die Partikelmenge eine Rolle. So ist belegt, dass eine größere Menge eine stärkere Entzündungsreaktion hervorruft [17]. Dies kann anhand unserer Ergebnisse deutlich bestätigt werden.

Der erste Teil unserer Ergebnisse passt zu publizierten Studien. Zum einen wurde bestätigt, dass kleinere Partikel, größere Immunreaktionen auslösen können, in unserem Fall anhand der Menge der in vitro produzierten Zytokine IL-1beta, IL-8 und IL-6. Diese spielen eine wichtige Rolle im Ablauf von Entzündungen und somit auch bei der Periimplantitis.

Das Interleukin-1 ist einer der ersten Aktivatoren der frühen Chemotaxis und erleichtert die Migration von Leukozyten in das Gewebe. Zusätzlich ist das Interleukin-1 einer der stärksten Stimulatoren der osteoklastischen Knochenresorption und hat einen Einfluss auf Metalloproteasen und deren Inhibitoren [47]. Man zählt das Interleukin-1 zu den endogenen Pyrogenen, da es unter anderem Fieber auslösen kann. Es besteht aus 2 Proteinen, dem IL-1alpha und dem IL-1beta, beide lösen ähnliche Effekte nach der Bindung an den IL-Rezeptor-Typ-1 aus. Heute weiss man, dass 11 Proteine in der IL-1-Familie existieren.

Das IL-1 ist ein proinflammatorisches Zytokin und induziert viele entzündliche Erkrankungen. Es stimuliert die Zellproliferation, Zelldifferenzierung und hat Effekte auf die Funktionen der angeborenen sowie der erworbenen immunkompetenten Zellen [48]. IL-1beta induziert zum Beispiel die Vasodilatation, was die Permeabilität der Blutgefäße steigert und somit zu einem Einstrom der Leukozyten und Proteinen auf die Seite der Entzündung führt. Desweiteren aktiviert es Hepatozyten zur Produktion der akute-Phase-Proteine, welche wichtig für die Opsonierung und später für die Phagozytose der Pathogene sind [49].

Auch bei Allergien spielt das IL-1 eine Rolle [50].

Der IL-1RA-Rezeptorantagonist (IL-1RA) wird durch denselben Stimulus synthetisiert und sezerniert wie das IL-1. Der IL-1RA dockt an der gleichen Stelle wie das IL-1 am IL-1-Rezeptor an und verhindert somit dessen Anlegen. IL-1RA-defiziente Mäuse entwickelten zum Beispiel chronisch entzündliche Polyarthropathien, weshalb auf dem Gebiet der Therapien viel auf das IL-1RA eingegangen wird [51].

Sezerniert wird das IL-1 von vielen Zellen darunter die Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten, Keratinozyten, Mikrogliazellen, Megakaryozyten, neutrophile Zellen und Fibroblasten. Der IL-Rezeptor-Typ-1 ist an vielen Zellen vorhanden, vor allem an den T-Zellen, Fibroblasten, epithelialen und endothelialen Zellen.

Es gibt fundamentale Unterschiede zwischen IL-1alpha und IL-1beta was die Lokalisation, Reifung und Sekretion anbelangt. Während zum Beispiel das Pro-IL-1alpha bereits vollständig biologisch aktiv ist, muss das Pro-IL-1beta erst noch durch die Caspase-1 aktiviert werden [52].

3 Gene regulieren die Produktion von IL-1, welche auf dem langen Arm von Chromosom 2 lokalisiert sind. Die Gene IL-1A und IL-1B kontrollieren die Produktion der proinflammatorischen Proteine IL-1alpha und IL-1beta, wohingegen das Gen IL-1RN die Produktion eines antagonistischen Proteins IL-1-ra kontrolliert.

Es herrscht ein Polymorphismus in den IL-1 Gengruppen der durch unterschiedliche Allele gekennzeichnet ist. Diese unterschiedlichen Allele werden mit der Freisetzung einer unterschiedlich hohen Menge an IL-1 Proteinen, als Reaktion auf eine bakterielle Entzündung, in Verbindung gebracht. Das Vorhandensein von Allel 2 in den polymorphen Gengruppen am Locus +3954 vom IL-1B-Gen, sowie am Locus -889 vom IL-1A-Gen, wird als Genotyp positiv bezeichnet. Es konnten höhere IL-1 Werte in der Sulkusflüssigkeit von Genotyp positiven Patienten gefunden werden. Auch hier wird kontrovers diskutiert ob, und in wieweit, diese unterschiedlichen Genotypen Einfluss auf die Periimplantitis haben [53].

Das IL-8 wird von einer Variation an Zellen produziert und sezerniert, darunter von Makrophagen, Monozyten, neutrophilen Zellen, Lymphozyten, endothelialen und epithelialen Zellen, Fibroblasten, Keratinozyten sowie von Chondrozyten, nach der Stimulation durch IL-1alpha, IL-1beta, IL-17 oder TNF-alpha [54].

Die Rezeptoren sind das IL-8RA (CXCR1) und das IL-8RB (CXCR2) [55]. Die Hauptfunktion vom Interleukin IL-8 ist die Aktivierung und die Rekrutierung von neutrophilen Zellen an den Ort der Infektion oder Verletzung [56]. Die Menge von IL-8 ist also während Entzündungen im Körper, sowohl viraler als auch bakterieller Natur, erhöht [57].

Das IL-6 ist ein multifunktionelles, pleiotropes Zytokin, welches in der Immunreaktion, der Akute-Phase-Reaktion, der Hämatopoese und der Entzündung involviert ist. Es wird von endothelialen Zellen, Fibroblasten, Monozyten und Makrophagen, als Reaktion auf unterschiedliche Stimuli, während der Entzündungsreaktion produziert. Zu diesen Stimuli gehören das IL-1, IL-17 sowie TNF-alpha. Der Rezeptor von IL-6 besteht aus dem IL-6Ralpha sowie der Komponente gp130. Es existiert sowohl in membrangebundener als auch in freier Form [58].

Während der angeborenen Immunreaktion, führt das IL-6 die Aktivierung und die Handlungen der Leukozyten und induziert die Produktion der Akute-Phase-Proteine in den Hepatozyten [59]. Es induziert zudem, sowohl die Proliferation der T-Zellen, die Differenzierung der B-Zellen sowie die Produktion von IgG, IgA und IgM durch die Plasmazellen [60].

Desweiteren konnten wir anhand der unterschiedlich gewählten Konzentrationen der Partikel entdecken und belegen, dass die Menge ebenfalls ausschlaggebend ist und nicht alleine die Partikelgröße eine Rolle spielt.

Anhand der Literatur sind demnach die Nanopartikel, wie auch in unseren Analysen die Rutil- und Anatase-Partikel, sowohl als sehr nützlich und dennoch auch als potenziell gefährlich einzustufen und sollten deshalb weiteren Untersuchungen nicht vorenthalten werden. Die hohe proinflammatorische Wirkung, gemessen anhand der in-vitro-Zytokinproduktion, der TiO₂-Rutil-Partikel war deutlich in unseren Ergebnissen zu sehen.

Oberflächenbeschaffenheit, zusätzlich enthaltene Legierungskomponenten und Oberflächenkontamination (speziell bakterielle Bestandteile) sind natürlich auch zu berücksichtigen.

5.2 Zusammenhang zwischen Genotyp, Komplikation und IL-1beta-Produktion

In unseren Ergebnissen konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Genotyp und der Implantat-Komplikation nachgewiesen werden. Zu den 4 verschiedenen Genotypen gab es jeweils ähnlich viele Fälle an Patienten mit gut vertragenen Implantaten und Patienten mit Komplikationen. Keine signifikanten Unterschiede ließen sich hierbei herauslesen. Allerdings konnte man in unseren Ergebnissen beim Genotyp 3, proportional zur Gesamtzahl an Patienten mit Genotyp 3, prozentual mehr Patienten mit Komplikationen zählen als bei den anderen Genotypen. Es lässt sich also eine Tendenz beim Genotyp 3 zu höheren Komplikationsfällen feststellen.

Laut der Firma Bioscentia gibt es 4 unterschiedliche Genotyp-Definitionen die sich aus unterschiedlichen IL-1-Allel-Kombinationen zusammensetzen. Dazu gehören folgende Hauptgene mit ihren zugehörigen Genloci:

- Interleukin 1A: -Allel 1 (-C889) –Allel 2 (-889T)
- Interleukin 1B: -Allel 1 (+C3953) –Allel 2 (+3953T)
- Interleukin 1RN: -Allel 1 (+T2018) –Allel 2 (+2018C)

Die dazugehörigen Proteine sind das IL-1alpha, das IL-1beta und das IL-1ra. Liegt das Allel-2 bei einem oder mehreren von diesen Genen vor, wird bei diesem Patienten ein potentiell Risiko für periimplantäre Entzündungen vorausgesagt [53]. Es wurde von der Firma Bioscentia für jedes Allel ein positiv/negativ Test durchgeführt. Aus den vorliegenden unterschiedlichen Allelen bei den jeweiligen Patienten ergeben sich dann folgende Genotypen:

- Genotyp 1: Patient mit normaler Entzündungsreaktion. Kein erhöhtes genetisches Risiko für progressive Parodontitis.
- Genotyp 2: Patient mit erhöhter Entzündungsreaktion. Erhöhtes genetisches Risiko für progressive Parodontitis
- Genotyp 3: Patient mit stark erhöhter Entzündungsreaktion. Stark erhöhtes genetisches Risiko für progressive Parodontitis.
- Genotyp 4: Patient mit genetisch bedingter verminderter Entzündungshemmung, häufig bei Periimplantitis.

Anhand der von der Firma Bioscentia festgelegten Genotypen, die in den Ergebnissen erläutert wurden, dürften nun alle Patienten mit Implantat-Komplikationen eher einen Genotyp 2, 3 oder 4 aufzuweisen haben. Dies konnte anhand unserer Untersuchungen jedoch nicht bestätigt werden. Allerdings sind die Resultate unserer Implantierungen zu 82,7% sehr positiv ausgefallen, was die Zahl der Fälle mit Komplikationen extrem niedrig hält und dessen Aussagekraft etwas senkt. Dies könnte eine der Erklärungen sein weshalb die Korrelation zwischen Genotyp und Komplikation in unseren Ergebnissen nicht eindeutig bestätigt wird. In der weiteren Diskussion wird dieses Thema tiefgründiger untersucht um mögliche Gründe und Erklärungen für unsere vorliegenden Ergebnisse zu finden.

Der Hauptgrund weshalb das Allel 2 stärkere Immunreaktionen und Entzündungen auslöst, soll laut Aussagen mehrerer Studien aufgrund der stärkeren IL-1-Produktion bei Vorliegen dieses Allels sein. Die genetischen Varianten IL-1A -889 (Allel1/2) oder IL-1A -889 (Allel2/2) und IL-1B +3953 (Allel1/2) oder IL-1B +3953 (Allel2/2) sind assoziiert mit einer höheren Produktion an IL-1alpha und IL-1beta [61]. IL-1RN +2018 (Allel1/2) oder IL-1RN (Allel2/2) korreliert mit einer niedrigeren Produktion an IL-1Ra [62] und TNFA -308 (Allel1/2) oder TNFA -308 (Allel2/2) ist mit einer siebenfach höheren Konzentration an TNF-alpha assoziiert [63].

Wir haben daher unsere Untersuchungen vertieft, nachdem zwischen dem Genotyp und der Implantat-Komplikation kein direkter Zusammenhang gefunden werden konnte. Wir haben geschaut, ob bei den Patienten ein Zusammenhang zwischen dem Genotyp und der Menge an produziertem IL-1-beta, welches wir in vitro gemessen haben, bestand. Da wir in unseren Untersuchungen nur das IL-1beta gemessen haben und nicht das IL-1alpha oder IL-1ra, beschränken sich die Ergebnisse auf das Interleukin 1B Gen.

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen dem Genotyp und der dazugehörigen Menge an produziertem IL-1-beta waren bei den folgenden Stimuli zu finden: Anatase-Partikel in allen 3 Konzentrationen, sowie bei dem Rutil-Partikel mit der höchsten Konzentration. Bei jeglichen weiteren Stimulantien, auch beim Titanplättchen, waren die produzierten IL-1-beta Mengen relativ gleichmäßig in den unterschiedlichen Genotyp-Gruppen verteilt. Die deutlichen Unterschiede waren bei den Anatase- und Rutil-Partikeln jedoch zwischen jeweils anderen Genotypen festzustellen.

Bei den Anatase-Partikeln war der Genotyp 2 mit Komplikationen derjenige bei dem die IL-1-beta Produktion am stärksten war, signifikante Unterschiede gab es bei diesem und dem Genotyp 1 ohne Komplikation, dem Genotyp 2 ohne Komplikation, dem Genotyp 3 ohne Komplikation und dem Genotyp 4 mit Komplikation. Beim Genotyp 2 mit Komplikationen blieb die produzierte IL-1beta Menge statistisch signifikant höher im Vergleich zu all den anderen genannten Genotyp-Kombinationen. Der Genotyp 2 scheint, gemessen anhand der IL-1beta-Werte, die stärkste proinflammatorische Reaktion auszulösen.

Der Genotyp 2 soll ein erhöhtes genetisches Risiko darstellen, womit die höheren Interleukin-Werte bei diesem Genotyp im Vergleich zum Genotyp 1 die Aussage von

der Firma Bioscientia belegen. Da sowohl beim Genotyp 2 als auch beim Genotyp 3, das Interleukin 1B vorwiegend in der Allel 2 Form vorhanden war, dürften hier ähnliche Ergebnisse zu erwarten sein. Doch auch hier war der Unterschied signifikant. Dies könnte daran liegen, dass der signifikante Unterschied von den Komplikationen abhängig ist. Beim Genotyp 2 mit Komplikationen sind nämlich die Zahlen von IL-1beta signifikant höher als beim Genotyp 3 ohne Komplikationen und nicht im Vergleich zum Genotyp 3 mit Komplikationen. Der Grund warum die IL-1beta Produktion beim Genotyp 2 wieder stärker ist als beim Genotyp 4 erscheint auch als folgerecht, da beim Genotyp 4 das Interleukin 1B meist in der Allel 1 Form auftritt. Man kann aus diesen Ergebnissen also schließen, dass die Produktion des IL-1beta von den Genotypen abhängig ist. Ist das Allel 2 vorhanden, wird mehr IL-1beta produziert.

Bei Rutil-Partikeln wiederum war die IL-1beta-Produktion beim Genotyp 1 ohne Komplikationen signifikant höher, verglichen mit dem Genotyp 3 und 4 ohne Komplikationen. Auch der Genotyp 2 ohne Komplikationen hatte eine stärkere IL-1-beta Produktion als Genotyp 3 und 4 ohne Komplikation. Wenn das Stimulanz ein Rutil-Partikel ist, scheint also bei den Genotypen 1 und 2 eine wesentlich stärkere proinflammatorische Reaktion abzulaufen, gemessen an den IL-1beta-Werten, als bei Genotyp 3 und 4.

Bezogen auf die vorhandenen Gene in den unterschiedlichen Genotypen erscheinen die signifikant höheren Werte von IL-1beta beim Genotyp 2 im Vergleich zum Genotyp 4 als einleuchtend. Beim Genotyp 4 liegt das Interleukin 1B Gen in der Allel 1 Form dar und beim Genotyp 2 in der Allel 2 Form. Unschlüssig bleibt allerdings, warum beim Genotyp 1 die IL-1beta Werte so hoch sind. Im Vergleich zum Genotyp 4 wären ähnliche Werte zu erwarten gewesen, da sowohl die Genotypen 1 als auch die Genotypen 4 beim Interleukin 1B, das Allel 1 vorliegen haben. Im Vergleich zum Genotyp 3 bleiben die Ergebnisse sinnwidrig, da hier eindeutig höhere IL-1beta Werte beim Genotyp 3 zu erwarten gewesen wären.

Diese Ergebnisse korrelieren also nur teilweise mit den Ausgangsthesen von der Firma Bioscientia.

Interessant scheint wieder, dass sich bei den Rutil-Partikeln nur in hoher Konzentration etwas aussagen lässt. Befindet sich die Konzentration dieser Partikel unter einem bestimmten Wert, kristallisiert sich kein Unterschied in der proinflammatorischen Reaktion heraus.

Bei den Anatase-Partikeln sieht dies etwas anders aus, hier sind die Unterschiede in der Entzündungsreaktion deutlich in allen 3 unterschiedlichen Konzentrationen zu erkennen.

Bei den Titanplättchen wiederum, kristallisiert sich kein Unterschied heraus.

Dies zeigt, dass die kleineren Partikel nicht nur eine stärkere IL-1beta Produktion zur Folge haben, sondern auch eine spezifischere. Anhand der Rutil-Partikel kann man auch wieder feststellen, dass die Konzentration einen Einfluss auf die Spezifität ausübt.

Ob das Vorhandensein des Allel 2 beim IL-1-Gen das Risiko für eine Periimplantitis steigert, wurde bereits in etlichen Studien untersucht.

Hamdy et. al. haben bei ihren Untersuchungen bei der Patientengruppe, welche sowohl am Gen Interleukin 1A als auch 1B das Allel 2 (IL-1A -889, IL-1B +3954) aufwiesen, deutlich häufiger eine Periimplantitis als Diagnose feststellen können als bei den Personen die dieses Allel nicht aufwiesen. Dies galt aber nur für Patienten die bei beiden Interleukinen, A und B, das Allel 2 aufwiesen, und somit als Genotyp positiv bezeichnet wurden. Diese könnte man mit unserem Genotyp 2, oder auch 3, gleichstellen. Diejenigen die das Allel 2 in beiden Genen nicht aufwiesen wurden als „Genotyp negativ“ benannt. Bei den „Genotyp positiven“ Patienten waren deutlich schlechtere klinische Werte an den Implantaten festzustellen, unter anderem tiefere Taschen und entzündliches, eitriges Exsudat. Zudem haben die Genotyp positiven Patienten, neben dem stärkeren Attachmentverlust, auch deutlich schlechter auf die nicht chirurgische Therapie angesprochen [53]. In dieser Studie konnte demnach dem Allel 2 beim IL-1A und B-Gen, ein eindeutiger Zusammenhang mit Implantat-Komplikationen nachgewiesen werden. In dieser Studie wurde allerdings das IL-1RN-Gen nicht berücksichtigt. Es wurde auch nicht über diejenigen Patienten berichtet, bei denen nur eines der beiden Gene, IL-1A oder B, das Allel 2 aufweisen. Es bleibt also die Frage wie das Ergebnis ausfallen würde, läge nur eines der beiden Gene in der Allel 2 Form vor. Der eindeutige Zusammenhang des Genotyps und der Komplikationen kann hier also nur bestätigt werden, wenn eine Kombination aus beiden Allel 2, IL-1A -889 und IL-1B +3954, vorliegt.

In unserer nächsten Studie wurde auch ein starker Zusammenhang zwischen der Parodontitis und dem Genotyp gefunden. Ähnlich wie in der Arbeit von Hamdy et al. konnte man den Zusammenhang zwischen Genotyp und Komplikation auch wieder bei Patienten feststellen, die das Allel 2 sowohl an IL-1A-Gen und IL-1B-Gen hatten. Auch hier wurde diese Gen-Kombination wieder als „Genotyp positiv“ bezeichnet. Es handelte sich um die Genloci IL-1A -889 und IL-1B +3953. Die Genotyp positiven Patienten hatten wieder eindeutig schlechtere klinische Werte an den Zähnen aufzuweisen, unter anderem ein stärkeres „bleeding on probing“, tiefere Taschen und stärkerer Knochenrückgang (radiologisch nachgewiesen). Ein weiterer Faktor der in dieser Studie relevant war, war der Raucherstatus. Nur bei Nichtrauchern konnte dieser starke Zusammenhang festgestellt werden. Handelte es sich bei den Patienten um Raucher, wurde kein Zusammenhang mehr zum Genotypen gefunden, was aussagen könnte, dass der Risikofaktor „Rauchen“ um einiges dominanter ist als der genetische Risikofaktor. Desweiteren wurden in dieser Studie auch diejenigen Patienten untersucht, die entweder für das IL-1A-Gen, das IL-1B-Gen, das IL-1RN-Gen oder das TNFalpha-Gen, das Allel 2 aufwiesen. Hier wurde kein signifikanter Zusammenhang gefunden. Patienten die für nur eines dieser Gene das Allel 2 aufwiesen, waren gleichmäßig über die Gruppen mild, moderat und schwere Parodontitis verteilt [64].

Ein weiterer Aspekt den man bedenken muss, ist ob das Allel 2, wenn vorhanden, in dem jeweiligen Gen in homozygoter oder heterozygoter Form vorliegt. Dies wurde von der Firma Bioscentia untersucht. In einer Studie konnte man herausfinden, dass Monozyten die das Allel 2 am Locus +3953 des IL-1B-Gens in homozygoter Form vorliegen hatten, das 4-fache an IL-1beta produzierten als solche die homozygot für

das Allel 1 waren. Lag das Allel 2 in heterozygoter Form dar, war die Produktion von IL-1beta nur mehr um das 2-fache höher als bei solchen mit Allel 1 homozygot [65, 66]. Sobald das Allel 2 vorliegt, ist die Produktion an IL-1beta demnach stärker. Allerdings macht das Vorhandensein des Allel 2 in homozygoter Form nochmals einen stärkeren Effekt aus.

In einer weiteren Studie wurde wieder der Interleukin-1-Gen Polymorphismus und dessen Korrelation mit dem IL-1beta- und 1alpha-Wert, sowohl in der Sulkusflüssigkeit als auch im Zahnfleischgewebe, untersucht. Das IL-1B-Gen wurde wieder an der Position +3953 untersucht, das IL-1A-Gen an Position +4845, welches allerdings laut di Giovine und Chaudhary (nicht publizierte Beobachtungen), zu 100% übereinstimmt mit dem Allel an Position +889. Es wurde wieder ein Parodontitis-assoziiierter Genotyp (PAG+) festgelegt, anhand des Allel 2 an der vorher genannten Position. Allerdings ist in dieser Studie nicht darauf eingegangen worden wie genau sich dieser zusammensetzt, das heißt ob er in der homozygoten oder heterozygoten Form vorliegt. In den Ergebnissen kam heraus, dass sich in den Taschentiefen von 4mm und weniger das 2,5-fache an IL-1beta bei den PAG+ Patienten befand im Vergleich zu den PAG- Patienten. In den mittleren Taschentiefen (4-6mm) und den tieferen (>6mm) waren die IL-1beta-Mengen ähnlich hoch. Ein weiterer Aspekt war hier wieder die Therapie, bei der die PAG- Patienten einen deutlichen Rückgang an IL-1beta Konzentrationen nach der Therapie nachweisen konnten, die PAG+ Patienten jedoch nicht. Dies zeigt wieder, dass Patienten mit diesem bestimmten Genotyp schlechter auf die Therapie ansprechen als solche die dieses Allel 2 nicht haben. Im Zahnfleischgewebe war sogar das 3,6fache an IL-1beta bei den PAG+ Patienten nachzuweisen. Bei den IL-1alpha Konzentrationen gab es im Gewebe zwischen den beiden Genotypen keine signifikanten Unterschiede [67].

Man geht davon aus, dass der Unterschied an IL-1beta Konzentration in den tieferen Taschen nicht mehr zu sehen ist. Der Grund ist, dass sich hier signifikant mehr Bakterien, Leukozyten und Makrophagen befinden, die die Hauptquelle an IL-1beta liefern und so den genetischen Einfluss überschatten, den man an den oberflächlicheren Taschen noch erkennen kann. In einer anderen Studie konnte ebenfalls ein Unterschied in der IL-1beta Konzentration zwischen den Patienten mit Parodontitis und gesunden Patienten nachgewiesen werden, welche bei denen mit Parodontitis höher war. Allerdings wurde hier kein signifikanter Unterschied zwischen den tieferen und den flachen Taschen gefunden. Diese Studie schlussfolgerte, dass die Konzentration der Zytokine spezifisch für die Patienten sei und nicht für die Lage. Sie prüften in dieser Studie nicht den Genotyp des Patienten [68].

In einer weiteren Studie wurde der „Genotyp positiv“ folgendermaßen definiert: er lag vor, wenn von jedem, IL-1B und IL-1A-Gen, mindestens ein mutiertes Allel, also Allel 2, vorliegt. Die heterozygoten Formen werden also auch mitgezählt [69]. Da in den ersten genannten Studien [53, 64] nicht beachtet wurde, ob die Allele homozygot oder heterozygot waren, könnte man denken dies sei schwierig zu vergleichen, da man ja weiß, dass die homozygote Form wesentlich stärkere IL-1beta Produktionen mit sich bringt als die heterozygote Form. Auf diese Fragestellung wird in der weiteren Diskussion genauer eingegangen. In dieser Studie von Meisel et al. konnte man herausfinden, dass der „Genotyp positiv“ eine starke Interaktion mit Rauchen zu haben scheint, wobei die Nichtraucher, auch wenn „Genotyp positive Patienten“ kein erhöhtes Parodontitis Risiko aufwiesen. Nur in der Gruppe „Raucher und Genotyp positiv“ gab

es höhere Attachmentverluste [69]. Dies belegt noch einmal, dass Rauchen einen extrem starken Risikofaktor darstellt.

Die Studie von Moreira et al. hat auch das Allel 2 am IL-1B-Gen unter die Lupe genommen, mit Rücksicht darauf ob es sich um eine heterogene oder homogene Form handelt. Es wurde zwischen gesunden Patienten, Patienten mit aggressiver und Patienten mit chronischer Parodontitis unterschieden. Bei Nichtrauchern war deutlich zu erkennen, dass das Vorhandensein von Allel 2 in Relation mit einer chronischen Parodontitis steht. Leute mit chronischer Parodontitis zeigten deutlich öfters das Allel 2 als diejenigen mit aggressiver Parodontitis und diejenigen die gesund waren nochmals weniger. Nahm man die Raucher mit hinzu war immer noch diese Tendenz zu sehen, aber nicht mehr so eindeutig. Bei denjenigen, die das Allel 2 in homozygoter Form trugen, das Allel 1 also gar nicht hatten, handelte es sich nur um Patienten mit chronischer Parodontitis. Gesunde Personen und diejenigen mit einer aggressiven Parodontitis wiesen diese Genkombination in dieser Studie nie auf [70].

Auch die Langzeitstabilität der Zähne scheint einen Zusammenhang mit dem Status „Genotyp positiv“ zu haben. Nach einer gesteuerten Geweberegeneration mithilfe von Membranen, konnte nach einem Jahr kein Unterschied zwischen dem Attachmentlevel der Zähne der Genotyp positiven und negativen Patienten festgestellt werden. Allerdings war nach 4 Jahren bei den Genotyp positiven Patienten ein Verlust von 50% von dem davor gewonnenem Attachmentlevel, verglichen mit den Genotyp negativen Patienten, zu sehen. Zusätzlich war eine 10-fach höhere Rate an 2 oder mehr mm Attachmentverlusten sichtbar bei den Genotyp positiven Patienten. Auch hier ist wieder nicht bekannt, ob das Allel 2 homozygot oder heterozygot vorlag, allerdings handelte es sich wieder um Patienten die sowohl für das IL-1A-Gen als auch für das IL-1B-Gen ein Allel 2 aufwiesen [71].

In weiteren Studien, die auch mithilfe der gesteuerten Geweberegeneration oder Knochentransplantation die Parodontitis behandelte, fand sich keinerlei Zusammenhang zwischen schlechteren Ergebnissen der Therapie und dem Vorhandensein des Genotyp positiv. Sowohl radiologisch als auch klinisch waren die Ergebnisse dieser Therapie, bei den Patienten mit und ohne „Genotyp positiv“ identisch. Allerdings handelte es sich in diesen Studien um Untersuchungen im Zeitraum von 9-12 Monaten nach der angewandten Therapie. In diesem Zeitraum war auch bei De Sanctis et al. noch kein Unterschied bei den verschiedenen Genotypen zu sehen [72, 73]

Es mag also sein, dass der Genotyp auf die Therapien der gesteuerten Geweberegeneration und der Knochentransplantation keinen Einfluss ausübt. Die einzige Studie die über einen längeren Zeitraum lief, war die Studie von de Sanctis et al. Es bleibt demnach unklar, wie die Ergebnisse der anderen Studien in den darauffolgenden Jahren ausgesehen hätten. So konnte auch in einer weiteren Studie, die über einen Zeitraum von 10 Jahren lief, ein Zusammenhang zwischen dem Genotyp und dem marginalen Knochenniveau festgestellt werden [74].

In einer anderen Studie wurden die Gene IL-1A -889, IL-1B +3953, IL-1RA +2018 sowie TNFA -308 in Bezug auf Titanimplantat-Verluste untersucht. Es wurde sowohl berücksichtigt ob nur bei einem dieser Gene oder bei mehreren das Allel 2 vorliegt oder ob dieses in der homozygoten oder der heterozygoten Form vorhanden war. Man

konnte feststellen, dass in der Gruppe der Patienten mit Implantatverlusten mehr Personen das Allel 2 trugen als die Kontrollgruppe, die keine Implantatkomplikationen aufwiesen. Dies galt für IL-1A, IL-1B und TNFA. Das Vorkommen des Allel 2 beim IL-1RN Gen war auch leicht erhöht in der Gruppe mit Komplikationen, jedoch nicht ganz so hoch wie bei den anderen Genen. Da die homozygote Form des Allel 2 so selten vorkommt, wurden die heterozygoten und homozygoten Träger in eine Gruppe gemischt und allein das Vorhandensein des Allels, ob homozygot oder heterozygot, schon als ein erhöhtes Risiko für Implantatverluste dargestellt. Es stellte sich auch heraus, dass mit jedem zusätzlichen Gen, welches das Allel 2 trägt, das Risiko des Implantatverlustes erhöht ist. Ein einzelnes erhöht das Risiko nicht signifikant, die Kumulation mehrerer steigert den Risikofaktor im Gegensatz erheblich [1]. Zu diesem Fazit sind auch weitere Studien gekommen, die besagen, dass nur die Kombination von Allel 2 sowohl bei IL-1A -889 als auch beim IL-1B +3953 Gen zu Implantatfrühverlusten führen [75, 76].

Da bei der Firma Bioscientia beim Genotyp 3 alle 3 Gene das Allel 2 aufweisen, müsste nach dieser Theorie der Genotyp 3 die schlechteste Prognose und Ergebnisse zeigen. Wenn man auf die Abb. 23 zurückblickt, sieht man dies in Bezug auf die Komplikationsrate auch.

Anhand der Ergebnisse der zuletzt erwähnten Studie, wäre die Fragestellung ob die Allele homozygot oder heterozygot vorliegen, geklärt. Das Allel 2 in der homozygoten Form könnte, aufgrund seiner Seltenheit, keine ausreichende Aussagekraft gehabt haben oder eventuell gar nicht vorhanden gewesen sein, weshalb wahrscheinlich auch nicht weiter darauf eingegangen worden ist. Dies lässt sich an unseren Patientendaten feststellen, wo man die Seltenheit der homozygoten Träger erkennt. Dass aber homozygote, wie in den Untersuchungen von Pociot et al. und Cork et al. [65, 66], noch eine stärkere IL-1beta-Produktion mit sich bringen als die heterozygote Form, darf dennoch nicht vernachlässigt werden.

Auch für das Vorhandensein des Allel 2 im IL-1RN Gen-Polymorphismus konnte ein eindeutiger Zusammenhang mit der Periimplantitis nachgewiesen werden, sowie auch wieder die Kombination aus dem Allel 2 an IL-1A und IL-1B Genen [77].

In einer weiteren Studie, in der es um Implantatverluste ging, konnte auch ein Zusammenhang mit dem Verlust des Implantates und dem IL-1B sowie dem IL-1RN Gen belegt werden. Das Vorhandensein vom Allel 2 konnte in Verbindung mit höheren Implantatverlustzahlen gebracht werden, sowohl beim heterozygoten Allel 2 Träger als auch, und vor allem, beim homozygoten Träger [78]. Desweiteren wurden in einer Studie die Gene IL-1A -889, IL-1B -511 und +3954 im Zusammenhang mit Knochenrückgang um das Implantat herum analysiert. Die Patienten, die homozygote Allel 2 Träger beim IL-1B -511 Gen waren, hatten signifikant mehr Knochenverlust um das Implantat herum als die, die heterozygote Allel 2 Träger oder nur Allel 1 Träger waren. In dieser Studie konnte beim marginalen Knochenverlust kein Unterschied zwischen den verschiedenen Genotypen bei den Genen IL-1B +3953 und IL-1A -889 zwischen der Kontrollgruppe und der Testgruppe gefunden werden. Dies zeigt, dass das Allel 2/2 (homozygot) beim IL-1B -511 Gen wohl eine starke Assoziation zum marginalen frühen Knochenverlust um enossale Implantate hat [79, 80].

Andere Studien wiederum fanden keinen Zusammenhang zwischen dem Genotyp und der Parodontitis. Ehmke et al. haben auch wieder einen Genotyp definiert, wobei das Allel 2 sowohl am IL-1B-Gen als auch am IL-1A-Gen vorliegt. Dieser Genotyp wurde in der Studie als IL-1-Haplotyp bezeichnet. Über das homozygote oder heterozygote Vorkommen des Allel 2 standen keine Informationen zur Verfügung. Es konnten keine Unterschiede zwischen IL-1-Haplotyp-positiven Patienten und negativen Patienten gefunden werden, was die Überlebensraten von Flächen oder Zähnen, die anfangs Taschen ab mindestens 2 mm hatten, angeht. Die Patienten bekamen in den 2 Jahren der Beobachtung eine konservative Therapie [81]. Diese Studie sagt vor allem etwas über die Progression der Parodontitis unter bestimmten genetischen Bedingungen aus. Die Patienten die das Allel 2 Gen in sich trugen hatten keine Nachteile, wenn sie unter einer geeigneten Therapie standen.

Ähnliche Aussagen konnten in weiteren Studien bestätigt werden, bei denen auch keine Unterschiede zwischen den Patienten mit Genotyp positiv und negativ, bei geeigneter Therapie, gefunden werden [82].

Auch in weiteren Longitudinalstudien wurde dem „IL-1-Genotyp positiv“ Interaktionen mit dem Rauchen, dem Alter und dem Bakterium *P. gingivalis* nachgewiesen. Die Werte waren hier schlechter als bei Patienten mit den jeweiligen Zusatzfaktoren und einem negativen IL-1-Genotyp, jedoch nur in Kombination mit einem dieser 3 anderen Risikofaktoren. Dies zeigt, dass der IL-1-Genotyp zwar als Co-Faktor agiert, und zur Schwere des Krankheitsbildes etwas beiträgt, er aber kein essentieller Risikofaktor für die Progression einer Parodontitis sein muss [83].

Anhand der meisten in dieser Arbeit zitierten Studien konnte man schlussfolgern, dass der Kompositionsgenotyp aus dem Vorhandensein des Allel 2 sowohl im IL-1A-Gen als auch im IL-1B-Gen eine Assoziation mit den Implantat-Komplikationen wie der Periimplantitis, den Implantatverlusten oder auch der Parodontitis hat. Das alleinige Vorhandensein von Allel 2 beim IL-1A-Gen oder beim IL-1B-Gen hat keinen bedeutenden Einfluss. Genau diese Beobachtungen konnten auch in einer Metaanalyse zwischen dem IL-1-Genotyp und Implantatversagen herausgefunden werden [84]. Diese wurde aufgrund der kontradiktorischen Aussagen etlicher Studien über dieses Thema durchgeführt. Das Ziel war es Klarheit zu diesem Thema zu schaffen. Neben dem Genotyp positiv, definiert als eine Kombination aus dem Allel 2 beim IL-1B-Gen (+3954) und IL-1A-Gen (-889), wie auch bei der Mehrheit unserer vorherigen erwähnten Studien, wird auch eine Assoziation zwischen dem Vorhandensein des Allel 2 beim IL-1B-Gen (-511) allein und dem erhöhten Risiko eines Implantatverlustes beziehungsweise eines Implantatversagens, zugesprochen. Zudem konnte zur Nomenklatur Klarheit geschaffen werden, was die genauen Gen-loci betrifft. Das IL-1B +3953, welches in manchen Studien so bezeichnet wurde, wurde umbenannt und wird jetzt als IL-1B-Gen +3954 bezeichnet. Der „Genotyp positiv“ wurde in vielen Studien nur mit der Parodontitis in Zusammenhang gebracht und es wurde angenommen, wie auch von uns, dass dieser Zusammenhang bei der Periimplantitis, ebenfalls vorläge. Dies wurde durch die Metaanalyse bestätigt [84].

In mehreren Studien wird dem Rauchen ein derart hohes Risikopotential für Implantatverluste zugesprochen, dass es heißt dieser Faktor würde den genetischen Wert übersteigern. In einer weiteren Studie ist die Sicht auf diese beiden Faktoren etwas anders. Der Genotyp positiv wurde wieder definiert als das Vorhandensein des Allel 2 sowohl beim IL-1A -889 als auch beim IL-1B +3953 Gen. Es wurde weder ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Genotyp positiv und dem Implantatversagen gefunden, noch ein Zusammenhang mit dem „bleeding on probing“. Allerdings war die Kombination vom Rauchen und Genotyp positiv ein sehr starker Risikofaktor und zeigte bei denjenigen Patienten deutlich mehr Implantatversagen. Man geht hier von einem Synergismus aus. Patienten die rauchten und Genotyp positiv waren, hatten allerdings kein statistisch relevant höheres Implantatversagen als Raucher mit Genotyp negativ, was wieder dafür spricht, dass Rauchen einen stärkeren Risikofaktor darstellt als der Genotyp. Zwischen weiblichen und männlichen Implantatträgern und zwischen den Regionen des Kiefers, in welche das Implantat eingesetzt wurde, konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede gefunden werden [85].

Vom Synergismus des Rauchens mit dem „Genotyp positiv“ ist auch in weiteren Studien die Rede. So hat ein „Genotyp positiv“ das Risiko des Zahnverlustes um das 2,7-fache erhöht und starkes Rauchen das Risiko um das 2,9-fache erhöht. Die Kombination aus beiden erhöhte das Risiko des Zahnverlustes allerdings um das 7,7-fache [86].

In einer weiteren Studie, mit ausschließlich rauchenden Implantatträgern, wurden auch die Gene IL-1B +3953, IL-1A -889 und IL-RN +2018 untersucht. Es gab 2 Gruppen, die eine mit Periimplantitis und die andere mit gut vertragenen Implantaten. In dieser Untersuchung konnte bei keinem Raucher ein Zusammenhang mit dem Genotyp und der Periimplantitis festgestellt werden [87]. Es wurden in dieser Studie allerdings auch nur die Gene einzeln betrachtet und nicht die Kombinationen aus mehreren Allel 2 Polymorphismen in mehreren Genen gleichzeitig. Wir wissen von vorherigen Studien bereits, dass die einzelnen Gene, die ein Allel 2 aufweisen, keinen bedeutenden Einfluss auf die Implantate haben. Es kann mit dieser Studie somit nicht unbedingt belegt werden, dass der Genotyp bei Rauchern gar keinen Effekt hat. Was bei der Studie eindeutig zum Vorschein kam, war, dass Leute mit einer Parodontitis-Vorgeschichte deutlich häufiger auch an Periimplantitis litten als solche ohne diese Vorgeschichte. In dieser Studie gab es neben, den Rauchern, auch noch viele Patienten mit Parodontitis als Vorgeschichte. Aus diesem Grund, nämlich den extrem starken Risikofaktoren, die diese Patienten alle aufwiesen, kann es durchaus sein, dass der Genotyp einfach keinen Einfluss mehr auf das Implantat ausübt. Würden diese Patienten nicht rauchen und hätten sie keine Parodontitis davor gehabt, hätte der Genotyp vielleicht auch in dieser Gruppe etwas ausmachen können.

Lachmann et al. konnten wieder keinen Zusammenhang zwischen dem Genotyp positiv (IL-1A -889 und IL-1B +3953) und der Periimplantitis erkennen. Auch hier kamen kontroverse Ergebnisse zum Vorschein wie etwa, dass bei Patienten mit gesunden Implantaten und einem Genotyp positiv niedrigere IL-1beta-Werte gemessen wurden, als bei denen mit einem Genotyp negativ und gesunden Implantaten. Auch beim Zusammenfügen derjenigen mit gesunden Implantaten und

jenen mit Periimplantitis, ergaben sich für die Patienten mit einem Genotyp negativ höhere IL-1beta Werte als bei denen mit Genotyp positiv. Lachmann et al. haben allerdings nur Implantate mit den tiefsten Taschen in Betracht gezogen, und schlussfolgerten daraus, laut der Aussage von Engebretson et al., dass Implantate mit flacheren Taschen eventuell auch Ergebnisse geliefert hätten, mit höheren IL-1beta Werten bei Patienten mit Periimplantitis [88].

In einer weiteren Studie wurde zwischen den Patienten mit Periimplantitis und der Kontrollgruppe ähnlich hohe IL-1beta Werte gemessen [89]. Es konnte hier keine Korrelation zwischen IL-1beta und Periimplantitis gefunden werden.

In anderen Studien wiederum wurden bei den Implantaten mit Entzündung, höhere IL-1beta Werte gemessen als bei denen mit gesunden Implantaten [90].

Nicht nur zwischen Patienten mit Periimplantitis und Patienten mit gesunden Implantaten konnten höhere IL-1beta Werte bei der Periimplantitis gemessen werden, sondern auch zwischen den Patienten die eine Mukositis aufwiesen und denen mit Periimplantitis, waren die IL-1beta Werte zu Gunsten der Periimplantitis höher [91].

Die Definition des Genotyps ist also wichtig und muss bei den unterschiedlichen Ergebnissen unbedingt berücksichtigt werden, um sichere Aussagen diesbezüglich treffen zu können. Dass der Genotyp etwas mit der verstärkten Produktion an IL-1-Proteinen zu tun hat und somit auch an einer stärkeren Entzündungsreaktion beteiligt ist, ist anhand der Studien, die dies belegen, kaum zu bestreiten. Nichtsdestotrotz konnten wir mit unseren Ergebnissen diese These nur teilweise bestätigen. Weshalb bei nicht kritischen Genotypen die IL-1beta Produktion teilweise sogar höher war als bei anderen Genotypen mit höherem Risiko, vergleichbar mit den Ergebnissen von Lachmann et al., könnte demnach an anderen Risikofaktoren gelegen haben. Wir wissen, dass es neben dem Genotyp noch andere Faktoren gibt, die eine erhöhte IL-1beta Produktion auslösen. Hierzu zählen unter anderem die Mundhygiene, das Rauchen, die Bakterienbesiedlung und systemische Faktoren [92-94]. Es besteht also die Möglichkeit, dass stärkere Faktoren den genetischen Effekt überlagern. Dies könnte beispielsweise daran liegen, dass die Patienten rauchten, eine schlechtere Mundhygiene betrieben oder andere Bakterienansiedlungen in den Taschen um die Implantate präsent waren, die für die IL-1beta Menge verantwortlich gewesen sein könnten.

Eine weitere Möglichkeit unklarer Ergebnisse besteht darin, dass die IL-1beta Mengen sich bei allen, auch bei den höheren Werten, in einem niedrigen Bereich befanden. Zu dieser Überlegung konnte man gelangen, da es in den meisten von uns untersuchten Studien um Implantatverluste, Knochenrückgang um die Implantate und Periimplantitis ging. Es handelte sich demnach um schwere Fälle der Implantat-Komplikationen, oft sogar verbunden mit dem Implantatversagen. In unseren untersuchten Fällen allerdings waren die Implantat-Komplikationen auf Mukositis, Entzündung, BOP und in ein paar sehr wenigen Fällen auf Periimplantitis beschränkt. In keinsten Weise konnte man bei einem Implantat ein Versagen, beziehungsweise einen Verlust dessen voraussagen. Wie in der Studie von Murata et al. war bereits zu sehen, dass die IL-1beta Werte bei Patienten mit Periimplantitis höher waren als bei solchen mit Mukositis. Dies würde erklären warum es keine Korrelation mit dem Genotyp und der Komplikation, beziehungsweise eine teilweise kontroverse Korrelation mit der IL-1beta Produktion, gegeben hat. Diese hielt sich einfach bei allen in einem Bereich, der nicht zu einem Implantatversagen führen würde.

Was sich hieraus also schlussfolgern lässt, ist die Tatsache, dass ein Patient mit einem „Risiko-Genotyp“ nicht unbedingt größere Komplikationen haben muss. Viele unserer Patienten mit gut vertragenem Implantat waren in diesen Genotyp-Gruppen vertreten. Hierzu bräuchte man mehr Fälle, bei denen es wirklich zu einer schweren Form der Periimplantitis mit Gefahr des Implantatverlustes gekommen ist. Daran würde man erkennen, ob sich die betreffenden Fälle wirklich in den Genotyp-Gruppen befinden würden, die als besonders risikoreich definiert sind. Die Erfolgsraten der Implantate liegen sehr hoch und werden in der Literatur zwischen 80 und 95% angegeben. Wenn wir in unseren Untersuchungen zählen, wie viele Patienten einen „Risiko-Genotyp“ aufweisen, kommen wir auf eine deutlich höhere Prozentzahl. Schon alleine aus diesem Grund scheint der Genotyp alleine nicht ausschlaggebend zu sein.

Ein weiterer Aspekt der unsere Untersuchungen von einigen der Studien unterscheidet ist, dass bei uns zusätzlich die In-vitro-Reaktivität der zirkulierenden Blutzellen getestet wurde. Uns interessierte, ob „die lokale Auseinandersetzung“ von Immunzellen mit dem Titanimplantat auch über die Reaktivität zirkulierender „Immunzellen“ (PBMC) erkennbar sein könnte. Es besteht natürlich die Möglichkeit, dass in vivo, direkt in der Implantat-Region, die Ergebnisse anders ausfallen und die IL-1beta Zahlen hier anders zu bewerten sind. Faktoren wie zum Beispiel die Mundhygiene während des Tragens der Implantate, konnten in unserer In-vitro-Analyse nicht nachgeahmt werden. Wie an der Studie von Engebretson et al. sichtbar wird, gibt es sogar Unterschiede der IL-1beta Werte in den Taschen selbst. In den tieferen Bereichen der Taschen waren die IL-1beta Werte um einiges niedriger als in den oberflächlicheren, was zeigt wie sensibel dieser Parameter ist und sogar in der direkten Umgebung zum Teil extreme Schwankungen in den Interleukin-Werten zeigt. Es könnte also sein, dass die In-vitro-Untersuchungen zu diesem Zweck nicht aussagekräftig genug sind.

Die meisten Studien haben die Zahl der produzierten Zytokine erst gar nicht untersucht, sondern nur anhand des Genotyps und der klinischen und radiologischen Parameter des Implantates entschieden, ob hier ein Zusammenhang vorhanden ist. Diese Studien sind einfach davon ausgegangen, basierend auf davor belegtem Wissen aus mehreren Studien, dass die Genotyp positiven Patienten höhere IL-1 Proteine produzieren und somit die Entzündungsreaktion steigern. Diejenigen Studien die auch selber die Zahl der IL-1 Proteine untersucht haben, haben dies zum Großteil anhand von Proben direkt aus der Mundhöhle vorgenommen [67, 88, 90, 91].

Engebretson et al. konnte mit dieser Methode einen Zusammenhang zwischen Genotyp und IL-1beta Werten finden. Lachmann et al. konnte allerdings, ähnlich wie in unseren Ergebnissen, dem nicht vollkommen zustimmen, trotz der Proben direkt aus der Mundhöhle.

Jacobi-Gresser et al. haben die Untersuchungen der IL-1beta Werte genau wie in unserer Studie in vitro durchgeführt. Trotz dieser Methodik konnten die Zusammenhänge bestätigt werden; der Genotyp korrelierte sowohl mit der Zahl an produziertem IL-1beta als auch mit dem Implantatverlust. Hier scheint die In-vitro-Analyse durchaus passend gewesen zu sein. Was diese Studie allerdings wieder von unserer Studie unterscheidet, ist die Tatsache, dass die Implantat-Komplikationen wieder weitaus schwerwiegender waren. Es handelte sich um Implantatverluste. Wie vorherig diskutiert, könnte dies auch der Grund sein, weshalb ein Zusammenhang in dieser Studie zu sehen ist und in unserer Studie nicht so eindeutig, abgesehen von den Fallzahlen der Komplikationen.

Ab wann und unter welcher Definition allerdings jemand als „Genotyp positiv“ bezeichnet werden kann, müsste nochmals einheitlich definiert werden. Erst dann kann man sagen, mit welchem Genotyp man konkret Gefahr einer Periimplantitis läuft. Was in den meisten Studien einheitlich herauskommt ist, dass die Kombination aus Allel 2 beim IL-1A -889 Gen und beim IL-1B +3954 Gen einen starken Effekt auf den Implantaterfolg hat. Dies sieht man anhand von unseren Ergebnissen auch wenn man sich den Genotyp 2 anschaut. Die einzelnen Gene scheinen diesen Effekt allein nicht zu haben. Außerdem geht aus den Studien hervor, dass das Allel 2 in homozygoter Form stärkere Auswirkungen hat als in heterozygoter Form. Allerdings scheint diese homozygote Form äußerst selten zu sein, weshalb sie des Öfteren vernachlässigt wird. All diese Punkte müssten bei der Genotyp-Definition einheitlich betrachtet werden.

Eine Frage, die auch noch nicht geklärt zu sein scheint ist, ob Rauchen nur ein einzelner starker Risikofaktor [64] ist oder eventuell synergetisch [69, 85, 86, 95] mit dem Genotyp funktioniert. Hier kamen in den Studien kontroverse Aussagen heraus, wobei häufiger von einem Synergismus als von einem einzelnen starken Risikofaktor gesprochen wird.

Man kann anhand unserer Ergebnisse sagen, dass ein risikoreicher Genotyp entweder:

- Nur teilweise relevant für periimplantäre Komplikationen sowie die IL-1beta Konzentration ist
- Bei den TiO₂-Anatase-Partikeln vermehrt IL-1beta-Produktion in vitro verursachte als bei den TiO₂-Rutil-Partikeln
- Von anderen Faktoren vermutlich überlagert wird
- Weniger aussagekräftig bei leichteren Implantat-Komplikationen ist
- In vitro noch nicht ausreichend beurteilt werden kann, abhängig oder unabhängig von den Taschentiefen, da hier kontroverse Ergebnisse aus Studien zur Verfügung stehen

5.3 Einfluss der Bakterien auf die Werte der Interleukine

Statistisch signifikant höhere in vitro Interleukin-Werte bei Kokultur von PBMC und Titanmaterialien, in Zusammenhang mit hohen Bakterienkonzentrationen periimplantär, konnten in unseren Ergebnissen beim grampositiven anaeroben Bakterium *Parvimonas micra* gefunden werden. Bei den Patienten mit stark oder sehr stark erhöhter periimplantärer *Parvimonas micra* Besiedlung, reagierten die zirkulierenden PBMC mit vermehrter Interleukin-1beta als auch Interleukin-8-Ausschüttung, bei Kontakt mit Titanmaterialien. Beim Interleukin-6 sind die Werte signifikant höher bei den Konzentrationen des *Parvimonas micra* „unter der Nachweisgrenze“ und „an der Nachweisgrenze“. Es wird also mehr IL-6 produziert je weniger *Parvimonas micra* vorhanden ist. IL-1beta sowie IL-8 scheinen eher auf das Vorhandensein des Bakteriums zu reagieren. Zu sehen waren diese Zusammenhänge bei den Stimuli TiO₂-Rutil-Partikel in den 2 höheren Konzentrationen sowie bei der Stimulation mit einem der 2 Titanplättchen der Firma Dentsply. Es scheint hier eine

Korrelation zwischen der Vor-Ort -Menge an *Parvimonas micra* und den von zirkulierenden PBMC produzierten Zytokinen zu geben. Damit ergibt sich ein Hinweis darauf, a) dass die Präsenz von *Parvimonas micra* am Implantat „immunogen“ auf Lymphozyten/ Monozyten wirkt und b) dass eine Sensibilisierung erfolgen könnte, worauf die erhöhte Zytokinantwort der zirkulierenden PBMC (hier aus der Blutprobe isoliert) dieser Patienten hindeutet. Man geht ja generell davon aus, dass „ein Austausch/ eine Re-Zirkulation“ ortsständiger und peripherer Lymphozyten erfolgt.

Die zentrale Pathogenese der Periimplantitis ist die entzündliche Osteoklastogenese induziert durch Infektion [96]. Es ist bereits bekannt, dass das Bakterium *Parvimonas micra* zu den parodontalpathogenen Bakterien zählt, die bei einer Periimplantitis vertreten sind. Es ist auch bekannt, dass periimplantäre Krankheiten infektiöser Natur sind und es hauptsächlich von einer unkontrollierten Akkumulation bakterieller Plaque ausgeht [97]. Viele Studien haben ergeben, dass die Langzeitprognose osseointegrierter Implantate vor allem von der Biofilmmasse und der bakteriellen Zusammensetzung des Biofilms abhängig ist [98-101].

Die Mikrobenflora besteht aus gemischten, eher variablen, in den meisten Fällen dominiert von gramnegativen anaeroben Bakterien [102]. Ubiquitäre Organismen, die auch in der chronischen Parodontitis zu finden sind, wie etwa *Fusobacterium* spp. und *P. intermedia* sind auch regelmäßig bei der Periimplantitis anzutreffen. Mikroorganismen, die weniger häufig in der chronischen Parodontitis anzutreffen sind, sind auch bei der Periimplantitis seltener zu finden. Als Beispiel gilt das *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa). Vergleichbar mit den natürlichen Zähnen gibt es bei den Implantaten auch unterschiedliche Bakterienzusammensetzungen in den unterschiedlichen Taschentiefen [103, 104]. Weitere Studien haben die Aussage getroffen, dass die vermeintlich pathogenen Bakterien in einem Mund bei der Parodontitis und der Periimplantitis identisch sind. Man geht davon aus, dass die parodontalpathogenen Bakterien von den natürlichen Zähnen auf die Implantate übertragen werden [105]. Diese Übertragung soll bereits in den 2 ersten Wochen nach Implantatinsertion geschehen. Somit ist dieselbe Bakterienkultur an den Implantaten zu finden, wie an den natürlichen Zähnen mit Parodontitis [106]. In der Studie von Danser et al. wird sichtbar, dass die parodontal geschädigten Zähne das Hauptreservoir der parodontalpathogenen Bakterien und somit auch die Hauptinfektionsquelle darstellen [107].

Gelegentlich wird der Periimplantitis eine Mikroflora zugesprochen, die sich von jener der Parodontitis unterscheiden soll. Dies betrifft das Auftreten von sporadisch hohen Zahlen an Peptostreptokokken (*Parvimonas micra*) oder Staphylokokken (*S. aureus* und *S. epidermidis*). Peptostreptokokken sind kommensale Organismen, die Abszesse und Nekrosen im Weichgewebe herbeiführen können. Das *Parvimonas micra* gehört laut mehreren Studien zu den parodontalpathogenen Bakterien und soll auch an der Progression dieser Krankheit mit beteiligt sein [108-110].

Nach neueren Studien ist das Bakterium *Parvimonas micra* auch während der Schwangerschaft erhöht und trägt somit womöglich zur Schwangerschaftsgingivitis bei, wo das Bleeding on probing (BOP) und auch die Sondierungstiefen bei den Frauen ansteigen [111]. Auch bei Rauchern wurde das *Parvimonas micra* häufiger

aufgefunden und auch mit höheren Taschensondierungstiefen in Verbindung gebracht [112].

S. aureus und *S. epidermidis* sind Pathogene, die vor allem bei Infektionen um implantierte medizinische Geräte vorkommen, welche die Hautbarriere durchqueren [113]. Es hat sich herausgestellt, dass *S. aureus* die Implantate möglicherweise direkt nach Implantatsetzung befällt [114] und dort lange persistiert [115].

Beim gleichen Individuum konnte in der Mundhöhle eine Implantat-spezifische Bakterienflora gefunden werden, die sich von jener der natürlichen Zähne differenzierte [116]. Eine größere Zahl unterschiedlicher Bakterien an den natürlichen Zahnflächen konnte auch in einer anderen Studie nachgewiesen werden. Allerdings wurde auch hier bestätigt, dass die Bakterienkultur, trotz der größeren Diversität an den natürlichen Zähnen, „sehr enge Beziehungen“ zwischen den Zähnen und den Implantaten aufweist [117].

Gemäß anderen Studien hat die Mikroflora an Periimplantitis-Flächen mehr Diversität im Vergleich zu gesunden Implantaten und Zähnen mit Parodontitis. Die meisten Bakterien waren an „gesunden und kranken“ Implantaten anzutreffen. Viele Bakterien, darunter auch *Parvimonas micra*, waren einzig und alleine an Periimplantitis-Flächen zu finden. Das *Fusobacterium nucleatum* war an allen Periimplantitis-Flächen zu finden, auch an Parodontitis-Flächen, jedoch nicht an den gesunden Implantatflächen [102]. In dieser Studie wurden von den jeweiligen Kategorien, Periimplantitis, gesunde Implantate und Parodontitis allerdings jeweils nur Proben von 3 unterschiedlichen Probanden entnommen, insgesamt also eine Probandenzahl von 9.

Die Oberfläche scheint ebenfalls ein wichtiger Faktor der Biofilmbildung darzustellen. So scheint die Rauheit der sandgestrahlten und geätzten Implantatoberflächen höher zu sein, als die der unbehandelten Implantatoberflächen und die Bakterienadhäsion deswegen auch deutlich höher zu sein [118]. Neben der Rauheit der Oberfläche bestimmt auch die Lage über die Formation und Adhäsion des Biofilms. Supragingival ist die Biofilmmakakkumulation signifikant höher als in subgingivalen Bereichen [119].

Zwischen den Pilzen, von denen *Candida* spp. (*C. albicans* und *C. boidinii*) in den Proben der Periimplantitis dominierte, und der Anwesenheit von *Parvimonas micra* und *T. forsythia*, bestand ein Zusammenhang. Es konnte keine Korrelation der Pilze und der Bakterien zum Krankheitsgrad gefunden werden. Sie wurden sowohl an gesunden Implantaten als auch an Implantaten mit Periimplantitis nachgewiesen [120]. Dies ist von Relevanz für unsere Ergebnisse, da viele unserer Implantate in einem gesunden Zustand waren und somit der Beweis gegeben ist, dass das Bakterium *Parvimonas micra* hier auch anzutreffen ist. An Zähnen mit einer Parodontitis-Vorgeschichte konnte dieser Zusammenhang, zwischen der Pilzbesiedlung und dem *Parvimonas micra* sowie *T. Forsythia*, nicht bewiesen werden [120].

Unterschiedliche Studien ergaben unterschiedliche Aussagen. In der einen wurde das Bakterium *P. micra* nicht an gesunden Implantatflächen gefunden [102], in der anderen allerdings ebenso häufig an gesunden wie an Periimplantitis-Flächen [120]. In der letztgenannten Studie gab es allerdings das Dreifache an Probanden als in der

erstgenannten. Da das Bakterium *P. micra* in unseren Ergebnissen in 61% der Fälle vorkommt und unsere Implantate zu 82,7% gesund waren, erscheint es angesichts der größeren Fallzahlen plausibel, *P. micra* auch an gesunden Implantatflächen anzutreffen.

Da bei den anderen Bakterien keine Korrelationen gefunden wurden zwischen Interleukin-Produktion *in vitro* und hohen Bakterienzahlen, scheint *Parvimonas micra* als einziges Bakterium, auch unabhängig von der restlichen Bakterienflora, Einfluss auf die Interleukinproduktion zu haben. Um zu sehen, ob dieser Zusammenhang auch eine Korrelation mit dem Schweregrad der Krankheit darstellt und *Parvimonas micra* für die Prognose der Periimplantitis aussagekräftig ist, müsste man allerdings noch mehr Fälle mit Komplikationen untersuchen und diese untereinander und mit einer Kontrollgruppe vergleichen. Zudem wäre eine Analyse der Vor-Ort-Zytokinproduktion interessant.

Dieser Zusammenhang war speziell bei der Stimulation mit TiO₂-Rutil-Partikeln zu sehen.

Die ersten Dokumentationen periimplantärer Plaque waren um 1983, wo man mit einer Kürette vom apikalsten Punkt der periimplantären Tasche, von unterschiedlichen Krankheitsgraden und Implantatformen, Proben entnahm. Die Proben von Implantaten mit Taschen die nicht tiefer als 5 mm waren, beinhalteten vor allem kokkoide Bakterien. Proben von Implantaten mit tieferen Taschen, die als nicht gesund eingestuft wurden, zeigten eine niedrigere Konzentration an kokkoiden Bakterien und eine höhere Konzentration an Spirochäten. Es wurden im Speichel zusätzlich, nach dem Setzen des Implantates, potentiell pathogene Mikroorganismen gefunden, zum Beispiel *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* Spezies und Enterobakterien [121]. 1986 fand man die Korrelation zwischen der Gingivitis und dem Vorhandensein von filiformen Bakterien und kleinen Spirochäten. Tiefere Taschen korrelierten signifikant mit einer steigenden Zahl an kleinen Spirochäten [122]. Im Plaque um die Titanimplantate mit Periimplantitis wurden besonders gramnegative anaerobe Bakterien gefunden, mit steigender Anzahl je tiefer die Tasche wurde [123]. Ein Jahr später verglich man erfolgreich osseointegrierte und erfolglos osseointegrierte Titanimplantate miteinander und fand bei denen mit einer Sondierungstiefe über oder gleich 6 mm, eitrigem Exsudat und einem radiologisch sichtbaren Knochenrückgang, vorwiegend gramnegative, anaerobe Stäbchen. Unter ihnen waren häufig in hohen Zahlen *Fusobacterium sp.* und *Prevotella intermedia* zu finden. Erfolgreich osseointegrierte Implantate wiesen vor allem grampositive Kokken auf. In den Proben von Implantaten die versagten, fand man reichlich mobile Stäbchen, fusiforme Bakterien und Spirochäten im Gegensatz zu denen, die erfolgreich verliefen. Hier waren diese nur in sehr kleinen Mengen anzutreffen [99]. Hohe Zahlen von anaeroben Bakterien waren bereits 2 Wochen nach der Implantation zu sehen. Das *Fusobacterium sp.* erst 42 Tage danach. Ab dem Tag 21 war ein ständiger Abfall der Zahlen der kokkoiden Bakterien, sowie ein stetiger Anstieg von Stäbchen zu beobachten. An Tag 120 wurden zum ersten Mal kleine Spirochäten gefunden; Eiter war klinisch sichtbar und Sondierungstiefen von 6 mm konnten gemessen werden [124]. Gramnegative anaerobe Bakterien in großer Zahl an kranken Flächen und kleinere Mengen an grampositiven Bakterien an gesunden Implantatflächen wurden gefunden [125]. 1990 wurde nach den Bakterien *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* und *P. gingivalis*

gesucht, welche teilweise an „erfolglosen“ Implantaten nachgewiesen werden konnten [126].

1991 wurden die Ursachen für die Implantatverluste zum ersten Mal in 2 Gruppen unterteilt; die infektiöse Gruppe sowie die traumatische Gruppe. Die infektiöse Gruppe zeigte klinische Zeichen wie Blutung, Eiterung, Schmerz, hohe Plaque- und Gingivaindizes. Die traumatische Gruppe zeigte Zeichen wie Mobilität, periimplantäre Transluzenz und keine der Zeichen der infektiösen Gruppe. Die infektiöse Gruppe zeigte hohe Zahlen an Spirochäten und mobilen Stäbchen, sowie das Vorhandensein einer großen Zahl an parodontalpathogenen Bakterien, wie etwa *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Fusobakterium* sp.. Zusätzlich wurden die Bakterien *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Parvimonas micra* nur in dieser Gruppe gefunden. *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* und *Candida* sp. wurden ebenfalls öfters in dieser Gruppe aufgefunden [127]. Außerdem wurden in einer weiteren Studie in demselben Jahr von 18 Implantaten bei denen die Osseointegration missglückte, in 6 Fällen das *Parvimonas micra* sowie *Campylobacter rectus* gefunden, in 5 das *Fusobakterium* sp. sowie das *Candida albicans* und in 4 das *Prevotella intermedia* nachgewiesen. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, nicht pigmentierte *Bacteroides* spp., *Capnocytophaga* sp. und Staphylokokken wurden ebenfalls an manchen dieser Implantate gefunden [128]. 1994 wurden von Kalykakis et al. folgende Ergebnisse geliefert: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in 12% bei zahnlosen Patienten entdeckt und in 17% bei teilbezahnten Patienten. *Prevotella intermedia* und *Porphyromonas gingivalis* waren in 19% der zahnlosen Patienten vertreten und in 39% der teilbezahnten. Generell hatten Implantate, die eines von den 3 Bakterien aufwiesen, signifikant höhere Sondierungstiefen, sowie stärkeres Bluten und eine höhere Sulkusflüssigkeitsrate [129]. Dies zeigt den starken Einfluss der Restbeziehung auf die Bakterienbesiedlung. 1997 wurden in einer Studie bei Implantatverlust, in höheren Mengen *P. nigrescens*, *P. micros*, *F. nucleatum* ss *vincentii* und *F. nucleatum* ss *nucleatum*, im Vergleich zu Patienten mit gesunden Implantaten gefunden [130]. In einer anderen Studie des gleichen Jahres wurden zahnlose Patienten mit einer aktuellen Periimplantitis und einer Parodontitis Vorgeschichte auf parodontalpathogene Keime untersucht. *Prevotella intermedia* wurde nur in solchen entdeckt, die Sondierungstiefen über 5 mm hatten. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Porphyromonas gingivalis* wurden hier nie entdeckt. Dagegen hatten alle das *Peptostreptococcus* spp. (*Parvimonas micra*) sowie das *Fusobakterium* sp. und andere *Prevotella* Arten. *Actinomyces odontolyticus*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter rectus*, *Pseudomonas* spp. und Enterobakterien wurden selten entdeckt [131].

2001 wurden in einer Studie bei Patienten mit Periimplantitis vor allem *Campylobacter rectus*, *Tannerella forsythia*, *Fusobakterium* spp., *Prevotella intermedia* und *nigrescens* gefunden. Das Vorkommen von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* und *Eikenella corrodens* war eher gering [132].

Bei Patienten mit Restbeziehung, wurde eine starke Korrelation zwischen der Sondierungstiefe an den Implantaten und der Zahl an anaeroben Bakterien sowie der Häufigkeit des Vorkommens von *Porphyromonas gingivalis* gefunden [133].

Bei einem marginalen Knochenverlust von mehr als 3 Gewindehalterungen nach dem ersten Jahr Belastung, konnten hohe Zahlen an *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* und *Treponema denticola* gezählt werden. Dies auch bei noch teilbezahnten Patienten [89].

In einer Studie von Leonhardt et al. wurden an 26 Titan-Implantaten von Patienten mit Restbezahnung in 7 Fällen *Prevotella intermedia* und *nigrescens* gefunden, in 6 Fällen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, in 3 Fällen *Escherichia coli* und *Enterobacter entericus*, in einem Fall *Porphyromonas gingivalis* und in einem anderen *Staphylococcus aureus* [134].

Porphyromonas gingivalis wurde auch in weiteren Studien nur bei den Patienten mit Periimplantitis gefunden, nicht aber bei den Patienten mit gesunden Implantaten [135]. Weiterhin fand man im Jahr 2006 heraus, dass die Verteilung der Bakterien von Implantat zu Implantat sehr unterschiedlich ausfällt. Bei Patienten mit Periimplantitis waren am häufigsten das *Prevotella nigrescens* und das *Fusobakterium*, gefolgt vom *Parvimonas micra* und dem *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [136]. In einer erweiterten Studie 2010 waren die am häufigsten vorkommenden Bakterien das *Fusobakterium nucleatum* sp., *Staphylococcus* sp., *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Helicobacter pylori* und *Tannerella forsythia* [137].

In der nächsten Studie wurden wiederum Unterschiede zwischen den Implantaten mit Periimplantitis und den gesunden Implantaten gefunden. Bei Patienten mit Periimplantitis konnten höhere Zahlen von *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* und *Tannerella forsythia* ermittelt werden. Allerdings bestand in dieser Studie kein Unterschied der Keimbelastung zwischen den supra- und subgingivalen Bereichen [138].

Eine andere Studie verglich die Keimbelastung zwischen der Periimplantitis und der Mukositis. Bei der Periimplantitis waren erhöht: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Fusobakterium* ssp., *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *Veillonella parvula* und *Aktinomyzeten*. Bei der Mukositis waren erhöht: *Capnocytophaga ochracea*, *Neisseria mucosa*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella nigrescens*, *Fusobakterium* ssp. und *Aktinomyzeten* [139]. Auch die Keime *Tannerella forsythia*, *Campylobacter* Spezies und *Parvimonas micra* wurden bei Periimplantitis identifiziert. Schmerz wurde mit *Parvimonas micra*, *Fusobakterium* und *Eubakterium* Spezies in Verbindung gebracht [140].

Ob die Zytokin-Produktion etwas über den Gesundheitszustand der Zähne aussagt, wurde in einigen Studien untersucht. So wurde bei Teles et al. anhand der Sulkusflüssigkeit untersucht, ob zwischen 10 ausgewählten Zytokinen und der Parodontitis ein Zusammenhang besteht. Man hatte neben den Patienten mit Parodontitis eine Kontrollgruppe an Patienten mit gesunden Zähnen. Es konnte in dieser Studie kein Zusammenhang zwischen den Zytokinen und dem Gesundheitszustand der Zähne gefunden werden. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang bestand zwischen Interleukin 8 mit der Sondierungstiefe und dem BOP. Es zeigte sich eine negative Korrelation des Interleukin 10 mit dem Attachmentlevel und dem BOP. Zwischen der Gruppe der Patienten mit und ohne Parodontitis konnten aber keine signifikanten Unterschiede in der Menge der Zytokine gemessen werden [141]. In dieser Studie wurde allerdings anhand der Sulkusflüssigkeit gemessen.

In anderen Studien wurden Korrelationen zwischen dem Schweregrad der Parodontitis und der Menge an gemessenen Zytokinen in der Sulkusflüssigkeit gefunden [142-148]. Zusätzlich wurde auch ein Absinken der Zytokinzahl nach Therapie und Verbesserung der Parodontitis gefunden [149-151].

Diskussion

Man hat auch herausgefunden, dass die Interleukine IL-1alpha, IL-8 und IL-6 im Gesamtspeichel in höherer Konzentration vorliegen als im Speicheldrüsensekret. Es wurde geschlussfolgert, dass diese aus der Sulkusflüssigkeit stammen müssen [152, 153].

Die Schweregrade der Parodontitis können bei Zytokinmessungen große Unterschiede zur Folge haben.

Bei Schwangeren konnte man nach der Schwangerschaft im Vergleich zur Zeit während der Schwangerschaft, auch Veränderungen in der oralen Bakterienflora und der Zytokinmessung feststellen. So gab es einen Zusammenhang zwischen dem sinkenden Level an *Porphyromonas endodontalis* und *Pseudomonas aeruginosa* und dem Sinken der Werte von IL-8 und IL-1beta. Zudem gab es auch eine Korrelation mit dem niedriger werdenden Bakterium *C. ureolyticus* und geringerem IL-1alpha. Allerdings war in dieser Untersuchung kein Zusammenhang der Zytokinmengen mit den parodontalpathogenen Bakterien zu sehen [111].

Im Großen und Ganzen ist die genaue Zusammensetzung der Periimplantitis-assoziierten mikrobiologischen Flora noch immer nicht eindeutig etabliert. Eine neuere Studie betont, dass die Rolle der pathogenen Bakterien generell neu interpretiert werden müsste [154].

Kürzlich haben Canullo et al. dem Bakterium *Parvimonas micra* eine große Rolle in Bezug auf die Periimplantitis zugeordnet. Beim Vorhandensein von *Parvimonas micra* in einer Konzentration von über $16,57 \times 10^4$ lag in 97.5% eine Periimplantitis vor. War die Anzahl an *Parvimonas* unter diesem Wert, lagen gesunde Implantate vor [155]. Dieses Bakterium scheint also einen sehr starken Einfluss auf das Auftreten der Periimplantitis zu haben. Basierend auf unsere Ergebnisse kann man zusätzlich schlussfolgern, dass die gesteigerte Produktion von IL-1beta und IL-8 in vitro durch PBMC bei lokaler *Parvimonas micra*-Besiedlung auch auf einen immunogenen Effekt mit Sensibilisierung deutet. Man konnte zusätzlich folgende Bakterien mit der Periimplantitis in Verbindung bringen anhand des Vergleichs mit einer Kontrollgruppe von gesunden Implantaten: *T. forsythia*, *T. denticola*, *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *P. micros*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *C. albicans*, *P. nigrescens*, *C. gracilis*, *C. ochracea*, *C. concisus*, *Streptococcus*, spp., *A. odontolyticus*, *V. parvula* und *E. faecalis*. Diese Bakterien waren bei Patienten mit Periimplantitis signifikant höher als bei Patienten mit gesunden Implantaten. Dem *Parvimonas micra* wurde anschließend von Canullo et al. eine besonders signifikante Rolle in der Krankheit zugesprochen.

Angesichts der unterschiedlichen Einflussfaktoren auf die Zytokinproduktion in vitro, bleibt nach wie vor die Frage wie stark die einzelnen Faktoren unabhängig voneinander Wirkung auf die Zahn- und Implantatgesundheit haben. Auf jeden Fall scheinen alle Faktoren, darunter der genetische, der bakterielle und der „Fremdmaterial-Effekt“, Einfluss auf die Zytokinproduktion und somit auf die Entstehung von Entzündung zu haben. Thomas et al. machten die interessante Beobachtung, dass bei gesunden Titanimplantatträgern deren PBMC eher weniger Zytokin-(speziell IL-1beta)Produktion in vitro gegenüber Titanmaterialien hatten. Sie

erklärten dies damit, dass vermehrt immunregulatorisches IL-10 produziert wurde [156].

Inwiefern eine „vorliegende“ Reduktion der lokalen *Parvimonas micra*-Besiedlung sinnvoll ist, bleibt zu untersuchen.

6 Zusammenfassung

Trotz hoher Erfolgsraten der Titan-Dentalimplantate gibt es frühe und späte Implantatverluste, zu deren Ursachen die Periimplantitis zählt. Neben der Bakterienbesiedlung wird auch die individuelle – möglicherweise von Zytokinpolymorphismen abhängige – Reaktion auf Titanpartikel in Betracht gezogen. Bei 136 Patienten im Alter von 24-84 Jahren lagen vollständige Datensätze vor. Es wurden die PBMC aus dem Blut isoliert und die Zellen wurden in Gegenwart von TiO₂-Rutil-Partikel, TiO₂-Anatase-partikel und Titanplättchen zweier Implantathersteller, sowie von Kontrollstimuli (Lipopolysaccharid, LPS, Tetanus Toxoid, TT und Phorbol-12-Myristat-13-Acetat, PMA) kultiviert. Ein Panel an freigesetzten Zytokinen im Überstand wurde im Multiplex-Verfahren durch Durchflusszytometrie (FACScanto) gemessen. Zudem wurden von den Studienpartnern die klinische Untersuchung und die standardisierten Abstriche zur Bakteriologie- und IL-1-Genotyp-Bestimmung vorgenommen.

In unseren Ergebnissen setzten PBMC vermehrt IL-8, IL-6 und IL-1 β und zwar signifikant höhere Werte auf TiO₂-Rutil-Partikel als auf TiO₂-Anatase-Partikel frei. Titanplättchen lösten eine niedrigere Reaktion aus als die TiO₂-Rutil-Partikel - allerdings eine stärkere Reaktion als die TiO₂-Anatase-Partikel. Außerdem war die Reaktion in vitro stärker, je höher die Konzentration war.

Anhang

Zwischen den Genotypen und den Implantat-Komplikationen ergaben sich keine klaren Zusammenhänge. Die Komplikationen waren relativ gleichmäßig über die Genotyp-Kategorien verteilt. Beim Genotyp 3 waren allerdings, proportional zur Gesamtzahl an Patienten mit Genotyp 3, mehr Patienten mit Komplikationen vorhanden.

Bei der Stimulation der PBMC mit den TiO₂-Anatase-Partikeln, wurden beim Genotyp 2 mit Komplikation deutlich höhere IL-1beta Werte in vitro gemessen. Bei der Stimulation der PBMC mit TiO₂-Rutil-Partikel, waren die höheren IL-1beta in vitro Werte bei den Genotypen 1 und 2 ohne Komplikationen zu sehen.

Beim enoralem Nachweis bestimmter Bakterien schien ein Zusammenhang, speziell zwischen der Menge an Parvimonas micra und dem Ausmaß der Interleukin-Produktion in vitro, zu bestehen. Bei höheren Konzentrationen dieses Bakteriums am Implantat waren die IL-1beta- und IL-8-Freisetzung durch „Blutzellen“ statistisch signifikant höher.

Der Genotyp hatte nur einen geringen Zusammenhang mit unseren Komplikationsraten – mit Einschränkung unserer nur kleinen und gering ausgeprägten „Komplikationsgruppe“. Allerdings kann man aufgrund anderer bedeutender Risikofaktoren und der Tatsache, dass viele Patienten mit einem risiko-assoziierten Genotyp trotzdem gesunde Implantate tragen, davon ausgehen, dass der Einfluss des Genotyps nur eine Nebenrolle beim Erfolg des Implantates spielt.

Das Bakterium Parvimonas micra scheint einen Einfluss auf das Immunsystem auszuüben und ein wichtiges pathogenes Bakterium bei der Periimplantitis darzustellen.

Unter Umständen ist speziell die Reduktion der Parvimonas micra Besiedlung als immunogener Faktor zur Prophylaxe von Komplikationen sinnvoll.

7 Anhang

7.1 Vergleich TiO₂-Rutil-Partikel mit TiO₂-Anatase-Partikel und Titanplättchen: T-Test bei unabhängigen Stichproben

Vergleich A1-R1

Gruppenstatistiken					
Stimulation		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IL_1beta	A1	136	15,9842	125,73466	10,66468
	R1	136	131,1506	262,74176	22,28547

T-Test bei unabhängigen Stichproben: P = **0,000001**

Anhang

Vergleich A2-R2

Gruppenstatistiken				
Stimulation	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IL_1beta A2	136	14,5716	125,96982	10,68462
R2	136	92,9735	202,38287	17,16589

T-Test bei unabhängigen Stichproben: P = **0,000001**

Vergleich A3-R3

Gruppenstatistiken				
Stimulation	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IL_1beta A3	136	16,6755	142,84980	12,11636
R3	136	52,6312	107,90625	9,15249

T-Test bei unabhängigen Stichproben: P = **0,019**

Vergleich R1-D1

Gruppenstatistiken				
Stimulation	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IL_1beta R1	136	131,1506	262,74176	22,28547
disc1	136	29,3896	101,29172	8,59145

T-Test bei unabhängigen Stichproben: P = **0,000001**

Vergleich R1-D2

Gruppenstatistiken				
Stimulation	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IL_1beta R1	136	131,1506	262,74176	22,28547
disc2	136	12,9240	59,91945	5,08230

Anhang

T-Test bei unabhängigen Stichproben: P = **0,000001**

Vergleich R2-D1

Gruppenstatistiken				
Stimulation	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IL_1beta R2	136	92,9735	202,38287	17,16589
disc1	136	29,3896	101,29172	8,59145

T-Test bei unabhängigen Stichproben: P = **0,000001**

Vergleich R2-D2

Gruppenstatistiken				
Stimulation	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IL_1beta R2	136	92,9735	202,38287	17,16589
disc2	136	12,9240	59,91945	5,08230

T-test bei unabhängigen Stichproben: P = **0,000001**

Vergleich R3-D2

Gruppenstatistiken				
Stimulation	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IL_1beta R3	136	52,6312	107,90625	9,15249
disc2	136	12,9240	59,91945	5,08230

T-Test bei unabhängigen Stichproben: P = **0,000001**

Vergleich A2-R2

Gruppenstatistiken				
Stimulation	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IL_6 A2	136	74,0647	520,47119	44,14579

Anhang

R2	136	641,1414	1541,86176	130,77901
----	-----	----------	------------	-----------

T-Test bei unabhängigen Stichproben: P = **0,000001**

Vergleich A3-R3

Gruppenstatistiken				
Stimulation	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IL_6 A3	136	91,2970	589,62410	50,01126
R3	136	388,2063	997,23969	84,58477

T-Test bei unabhängigen Stichproben: P = **0,003**

Vergleich A1-D1

Gruppenstatistiken				
Stimulation	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IL_6 A1	136	155,2474	738,47953	62,63702
disc1	136	1034,1437	4482,17398	380,17304

T-Test bei unabhängigen Stichproben: P = **0.024**

Vergleich A2-D1

Gruppenstatistiken				
Stimulation	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IL_6 A2	136	74,0647	520,47119	44,14579
disc1	136	1034,1437	4482,17398	380,17304

T-Test bei unabhängigen Stichproben: P = **0,013**

Vergleich A3-D1

Gruppenstatistiken				
Stimulation	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes

Anhang

IL_6	A3	136	91,2970	589,62410	50,01126
	disc1	136	1034,1437	4482,17398	380,17304

T-Test für unabhängige Stichproben: P = **0,015**

Vergleich A1-R1

Gruppenstatistiken					
Stimulation		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IL_8	A1	136	3255,3440	3834,38520	325,22831
	R1	136	8897,8408	6419,85133	544,52468

T-Test bei unabhängigen Stichproben: P = **0,000001**

Vergleich A2-R2

Gruppenstatistiken					
Stimulation		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IL_8	A2	136	2403,0885	2776,57811	235,50628
	R2	136	7874,2962	6088,51742	516,42131

T-Test bei unabhängigen Stichproben: P = **0,000001**

Vergleich A3-R3

Gruppenstatistiken					
Stimulation		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IL_8	A3	136	2784,5407	3946,88486	334,77040
	R3	136	6935,6596	5553,15579	471,01253

T-Test bei unabhängigen Stichproben: P = **0,000001**

Vergleich A3-D2

Gruppenstatistiken					
Stimulation		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes

Anhang

IL_8	A3	136	2784,5407	3946,88486	334,77040
	disc2	136	6210,0022	4934,41534	418,53165

T-Test bei unabhängigen Stichproben: P = **0,000001**

Vergleich A3-D1

Gruppenstatistiken				
Stimulation	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IL_8 A3	136	2784,5407	3946,88486	334,77040
disc1	136	6414,7771	5698,14679	483,31050

T-Test bei unabhängigen Stichproben: P = **0,000001**

Vergleich A2-D1

Gruppenstatistiken				
Stimulation	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IL_8 A2	136	2403,0885	2776,57811	235,50628
disc1	136	6414,7771	5698,14679	483,31050

T-Test bei unabhängigen Stichproben: P = **0,000001**

Vergleich A2-D2

Gruppenstatistiken				
Stimulation	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IL_8 A2	136	2403,0885	2776,57811	235,50628
disc2	136	6210,0022	4934,41534	418,53165

T-Test bei unabhängigen Stichproben: P = **0,000001**

Vergleich A1-D1

Gruppenstatistiken

Anhang

Stimulation		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IL_8	A1	136	3255,3440	3834,38520	325,22831
	disc1	136	6414,7771	5698,14679	483,31050

T-Test bei unabhängigen Stichproben: P = **0,000001**

Vergleich A1-D2

Gruppenstatistiken					
Stimulation		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IL_8	A1	136	3255,3440	3834,38520	325,22831
	disc2	136	6210,0022	4934,41534	418,53165

T-Test bei unabhängigen Stichproben: P = **0,000001**

Vergleich R1-D1

Gruppenstatistiken					
Stimulation		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IL_8	R1	136	8897,8408	6419,85133	544,52468
	disc1	136	6414,7771	5698,14679	483,31050

T-Test bei unabhängigen Stichproben: P = **0,01**

Vergleich R1-D2

Gruppenstatistiken					
Stimulation		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IL_8	R1	136	8897,8408	6419,85133	544,52468
	disc2	136	6210,0022	4934,41534	418,53165

T-Test bei unabhängigen Stichproben: P = **0,000001**

Vergleich R2-D1

Gruppenstatistiken

Anhang

Stimulation		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IL_8	R2	136	7874,2962	6088,51742	516,42131
	disc1	136	6414,7771	5698,14679	483,31050

T-Test bei unabhängigen Stichproben: P = **0,04**

Vergleich R2-D2

Gruppenstatistiken					
Stimulation		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IL_8	R2	136	7874,2962	6088,51742	516,42131
	disc2	136	6210,0022	4934,41534	418,53165

T-Test bei unabhängigen Stichproben: P = **0,013**

7.2 P-Werte im Kruskal-Wallis-Test

Anhang

IL-1beta	A1	0,22 7	A1	0,48 3	A1	0,02 9	A1	0,2	A1	0,84 2	A1	0,58 6	A1	0,80 8	A1	0,37 9
	A2	0,45 9	A2	0,44 5	A2	0,45 2	A2	0,16 5	A2	0,84 8	A2	0,39	A2	0,78 2	A2	0,80 9
	A3	0,38 1	A3	0,23 8	A3	0,93 7	A3	0,22 2	A3	0,98 3	A3	0,61 5	A3	0,79 1	A3	0,52 5
	R1	0,06 8	R1	0,66 7	R1	0,95 1	R1	0,09 5	R1	0,53	R1	0,29 4	R1	0,14 5	R1	0,46 8
	R2	0,01 8	R2	0,21 9	R2	0,95	R2	0,10 8	R2	0,57 1	R2	0,22 5	R2	0,16	R2	0,37 7
	R3	0,07 9	R3	0,13 2	R3	0,65 2	R3	0,07 5	R3	0,85 7	R3	0,50 7	R3	0,27	R3	0,70 3
	disc 1	0,03 5	disc 1	0,53 7	disc 1	0,54 3	disc 1	0,50 3	disc 1	0,70 1	disc 1	0,37 8	disc 1	0,25	disc 1	0,30 5
	disc 2	0,01	disc 2	0,25 4	disc 2	0,06 6	disc 2	0,12 9	disc 2	0,86 1	disc 2	0,83 5	disc 2	0,42 9	disc 2	0,35 4
IL-8	A1	0,00 1	A1	0,32 1	A1	0,12 7	A1	0,58 4	A1	0,55 7	A1	0,99 1	A1	0,49 3	A1	0,78 3
	A2	0,00 5	A2	0,48 1	A2	0,98 6	A2	0,87 2	A2	0,69 6	A2	0,97	A2	0,20 5	A2	0,74 8
	A3	0,02	A3	0,20 8	A3	0,65 1	A3	0,40 8	A3	0,96 9	A3	0,41 3	A3	0,59 8	A3	0,67 8
	R1	0,03 7	R1	0,73 3	R1	0,90 9	R1	0,70 2	R1	0,50 5	R1	0,37 3	R1	0,62 8	R1	0,61 5
	R2	0,01 3	R2	0,74 3	R2	0,98 7	R2	0,76 9	R2	0,42 6	R2	0,35 5	R2	0,62 8	R2	0,87 7
	R3	0,02 4	R3	0,74 4	R3	0,99 2	R3	0,42 5	R3	0,71 7	R3	0,3	R3	0,74 7	R3	0,91 7
	disc 1	0,00 1	disc 1	0,53 8	disc 1	0,80 1	disc 1	0,16 9	disc 1	0,66 4	disc 1	0,67 7	disc 1	0,53 1	disc 1	0,59 4
	disc 2	0,00 1	disc 2	0,04 6	disc 2	0,01 8	disc 2	0,17 2	disc 2	0,59 9	disc 2	0,65 7	disc 2	0,60 4	disc 2	0,70 8
IL-6	A1	0,04 5	A1	0,90 9	A1	0,02 9	A1	0,02	A1	0,52 9	A1	0,69	A1	0,42 1	A1	0,40 3
	A2	0,03 9	A2	0,97 6	A2	0,12 8	A2	0,13 8	A2	0,40 1	A2	0,71 3	A2	0,17 3	A2	0,93 9
	A3	0,08 6	A3	0,28 6	A3	0,92	A3	0,05 2	A3	0,69 5	A3	0,44 3	A3	0,39 1	A3	0,85 5
	R1	0,00 4	R1	0,71 2	R1	0,83 7	R1	0,16 2	R1	0,30 7	R1	0,41 5	R1	0,11 1	R1	0,14 3
	R2	0,01 2	R2	0,71 9	R2	0,88	R2	0,07 7	R2	0,30 3	R2	0,22 1	R2	0,22 3	R2	0,27 7
	R3	0,00 5	R3	0,24 8	R3	0,59 8	R3	0,06 2	R3	0,69 7	R3	0,46 4	R3	0,05 4	R3	0,68 4
	disc 1	0,02 9	disc 1	0,83 7	disc 1	0,48	disc 1	0,81 8	disc 1	0,57 6	disc 1	0,10 5	disc 1	0,03 4	disc 1	0,15 6
	disc 2	0	disc 2	0,24 4	disc 2	0,34 7	disc 2	0,12 7	disc 2	0,50 1	disc 2	0,74 4	disc 2	0,26	disc 2	0,10 7
	A1	0,43 3	A1	0,09 5	A1	0,73 7	A1	0,78 2	A1	0,38 6	A1	0,44 2	A1	0,50 9	A1	0,68 2
	A2	0,02 2	A2	0,18 3	A2	0,73 5	A2	0,76 4	A2	0,74 2	A2	0,00 5	A2	0,51 6	A2	0,61 7

Anhang

TNF-alpha	A3	0,41 2	A3	0,06 6	A3	0,81	A3	0,08 9	A3	0,31 2	A3	0,10 7	A3	0,46 3	A3	0,09
	R1	0,08 4	R1	0,93 1	R1	0,83 4	R1	0,13 2	R1	0,81 5	R1	0,47 9	R1	0,66 2	R1	0,55 1
	R2	0,00 1	R2	0,55 5	R2	0,42 8	R2	0,03 5	R2	0,96 4	R2	0,69 9	R2	0,67 4	R2	0,47 2
	R3	0,00 3	R3	0,72 4	R3	0,35 9	R3	0,00 7	R3	0,95 5	R3	0,95 1	R3	0,33 4	R3	0,78 8
	disc 1	0,00 4	disc 1	0,48 3	disc 1	0,20 9	disc 1	0,82 2	disc 1	0,98 8	disc 1	0,38 4	disc 1	0,19 7	disc 1	0,50 6
	disc 2	0,01 1	disc 2	0,23 9	disc 2	0,29 3	disc 2	0,62 6	disc 2	0,74 9	disc 2	0,87 5	disc 2	0,03 1	disc 2	0,38 2
IL-10	A1	0,66	A1	0,42 2	A1	0,50 9	A1	0,42	A1	0,85 8	A1	1	A1	0,53 4	A1	0,92 5
	A2	0,39 7	A2	0,51 9	A2	0,96 8	A2	0,37 5	A2	0,32 2	A2	0,80 6	A2	0,61 9	A2	0,90 1
	A3	0,83 6	A3	0,37 8	A3	0,39 2	A3	0,32 3	A3	0,87 1	A3	0,99 1	A3	0,73 2	A3	0,77 6
	R1	0,81 8	R1	0,10 8	R1	0,54 9	R1	0,91 2	R1	0,84 8	R1	0,74	R1	0,69	R1	0,96 7
	R2	0,96 8	R2	0,23 4	R2	0,45 1	R2	0,75 1	R2	0,61 9	R2	0,84 5	R2	0,83 7	R2	0,79 9
	R3	0,93 8	R3	0,20 5	R3	0,47	R3	0,59 8	R3	0,87 4	R3	0,95 8	R3	0,67 4	R3	0,66 5
	disc 1	0,16	disc 1	0,07 6	disc 1	0,34 8	disc 1	0,22 8	disc 1	0,50 2	disc 1	0,67 6	disc 1	0,39 7	disc 1	0,88 2
	disc 2	0,79 1	disc 2	0,42 8	disc 2	0,62	disc 2	0,92 3	disc 2	0,66 7	disc 2	0,87 8	disc 2	0,61 2	disc 2	0,93 8

8 Abkürzungsverzeichnis

PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
LPS	Lipopolysaccharide
TT	Tetanus Toxoid
ml	Milliliter
nm	Nanometer
M	Molar
ng	Nanogramm
μl	Mikroliter
μg	Mikrogramm
μm	Mikrometer
pg	picogramm
min	Minuten
PE	Phycoerythrin
BOP	Bleeding on probing
PSI	Parodontaler Screening-Index
PBI	Papillen Blutungs Index
N	Menge/ Anzahl
%	Prozent
°C	Grad Celcius
U/min	Umdrehung pro Minute
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
+	Positive
-	Negative
Aa	Aggregatibacter
	actinomyces comitans
Cg	Capnocytophaga gingivalis
Ec	Eikenella corrodens
En	Eubacterium nodatum
Pm	Parvimonas micra
Pg	Porphyromonas gingivalis
Td	Treponema denticola
Tf	Tannerella forsythia
Pi	Prevotella intermedia
Fn	Fusobacterium nucleatum
Cr	Campylobacter rectus
IL	Interleukin
TNF	Tumornekrosefaktor
IFN	Interferone
Ig	Immunglobulin
Gp130	Glycoprotein130
Abb.	Abbildung
Tab.	Tabelle
-	Unter der Nachweisgrenze
(+)	An der Nachweisgrenze

Abkürzungsverzeichnis

+	Erhöht
++	Stark erhöht
+++	Sehr stark erhöht
TiO ₂	Titandioxid
N	Stickstoff
C	Kohlenstoff
Ca	Kalzium
P	Phosphor
Cl	Chlor
Na	Natrium
S	Schwefel
Si	Silicium
PAG	Parodontitis-assoziiertes Genotyp
IgG	Immunglobulin G
IgA	Immunglobulin A
IgM	Immunglobulin M

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Metallpartikel induzierter Entzündungsablauf im Makrophagen [17].....	8
Abbildung 2: Links: Direkte Methode, der Primärantikörper ist bereits mit einem Fluorochrom gelabelt. Rechts: Indirekte Methode, der Sekundärantikörper ist gelabelt und bindet an den ungelabelten antigenspezifischen Antikörper (Quelle: Abb. eigenständig angefertigt mithilfe des Word-Programms)	18
Abbildung 3: Ein laminarer Probenstrom wird an einem Laser vorbeigeleitet (Quelle: Abb. eigenständig angefertigt mithilfe des Word-Programms)	19
Abbildung 4: Präparation der Standardreihe (Quelle: Human Soluble Protein Master Buffer Kit; Instruction Manual)	20
Abbildung 5: Durchflusszytometrie-Ablauf (Quelle: BD Cytometric Bead Array; Multiplexed Bead-Based Immunoassays	21
Abbildung 6: BD FACS Canto Gerät (Quelle: Aufnahme erfolgte am Arbeitsplatz der Universitätshautklinik in München).....	22
Abbildung 7: Messung einer Probe (Quelle: Aufnahme erfolgte am Arbeitsplatz der Universitätshautklinik in München).....	22
Abbildung 8: IL-1beta Mittelwerte bei den unterschiedlichen Stimulantien (A= Anatase-Partikel; R= Rutil-Partikel; disc= Titanplättchen; tetanus toxoid, PMA=Phorbol-12-Myristat-13-Acetat, LPS= Lipopolysaccharid, jeweils als Kontroll-Stimulus).....	24
Abbildung 9: IL-6 Mittelwerte bei den unterschiedlichen Stimulantien; Abkürzungen siehe Legende zu Abb. 8.....	25
Abbildung 10: IL-8 Mittelwerte bei den unterschiedlichen Stimulantien; Abkürzungen siehe Legende zu Abb. 8.....	26
Abbildung 11: Genotyp Verteilung bei den 24 Patienten mit Komplikationen	28
Abbildung 12: Genotyp Verteilung bei den 112 Patienten ohne Komplikationen.....	28
Abbildung 13: Verteilung der Komplikationen in Prozentangabe über die Genotypen	29
Abbildung 14: IL-1beta Werte bei der Stimulation mit Anatase 1 unterteilt nach Genotyp und Komplikation	31
Abbildung 15: IL-1beta Werte bei der Stimulation mit Anatase 2 unterteilt nach Genotyp und Komplikation	32
Abbildung 16: IL-1beta Werte bei der Stimulation mit Anatase3 unterteilt nach Genotyp und Komplikation	33
Abbildung 17: IL-1beta Werte bei der Stimulation mit Rutil 1 unterteilt nach Genotyp und Komplikation.....	34
Abbildung 18: IL-1beta Werte unter der In-vitro-Stimulation von Rutil 2 bei Patienten mit den unterschiedlichen Konzentrationen vom Bakterium Pm	37
Abbildung 19: IL-8 Werte unter der In-vitro-Stimulation von Rutil 1 bei Patienten mit den unterschiedlichen Konzentrationen vom Bakterium Pm	38
Abbildung 20: IL-8 Werte unter der Stimulation von Rutil 2 bei Patienten mit den unterschiedlichen Konzentrationen vom Bakterium Pm	39
Abbildung 21: IL-8 Werte unter der Stimulation von Disc 2 bei Patienten mit den unterschiedlichen Keimkonzentrationen vom Bakterium Pm.....	40
Abbildung 22: IL-6 Werte unter der Stimulation von Disc 2 bei Patienten mit den unterschiedlichen Keimkonzentrationen vom Bakterium Pm.....	41

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Keime, die in mikrobiologischer Diagnostik von der Firma Bioscentia erfasst wurden [10].....	4
Tabelle 2: Patientendaten	10
Tabelle 3: MACS	14
Tabelle 4: Komplikationen	27
Tabelle 5: Genotyp Verteilung; mit und ohne Komplikationen	28
Tabelle 6: Hauptgene mit dazugehörigen Genloci über die Genotyp Gruppen verteilt	30
Tabelle 7: IL-1beta Mittelwerte bei den Genotypen 1-, 2+, 4+, 3-, 2- durch die Stimulation mit Anatase.....	31
Tabelle 8: : IL-1beta Mittelwerte bei den Genotypen 1-, 2+, 4+, 3-, 2- durch die Stimulation mit Anatase 2.....	32
Tabelle 9: : IL-1beta Mittelwerte bei den Genotypen 1-, 2+, 4+, 3-, 2- durch die Stimulation mit Anatase 3.....	33
Tabelle 10: IL-1beta Mittelwerte bei den Genotypen 1-, 4-, 3-, 2- durch die Stimulation mit Rutil 1.....	34
Tabelle 11: Fallzahlen der Keimkonzentrationen bei 136 Patienten (Aa = Aggregatibacter Actinomycetemcomitans, Pg = Porphyromonas gingivalis, Tf = Tannerella forsythia, Td = Treponema denticola, Pi = Prevotella intermedia, Pm = Parvimonas micra, Fn = Fusobacterium nucleatum, Cr = Campylobacter rectus, En = Eubacterium nodatum, Ec = Eikenella corrodens, Cg = Capnocytophaga gingivalis)	36

11 Literaturverzeichnis

1. Jacobi-Gresser, E., K. Huesker, and S. Schutt, *Genetic and immunological markers predict titanium implant failure: a retrospective study*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2013. **42**(4): p. 537-43.
2. Palti, A., *Back to the roots: Die 2000-jährige Geschichte der Implantation*. Implantologie Journal, 2003.
3. Schwenzer, N. and M. Ehrenfeld, *Zahnärztliche Chirurgie*. 4th ed. Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde. 2009, Stuttgart: Thieme.
4. Gernet, W., et al., *Zahnärztliche Prothetik*. 4th ed. Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde. 2011, Stuttgart: Thieme.
5. Holm-Pedersen, P., N.P. Lang, and F. Muller, *What are the longevities of teeth and oral implants?* Clin Oral Implants Res, 2007. **18 Suppl 3**: p. 15-9.
6. Reich, E. and K.A. Hiller, *Reasons for tooth extraction in the western states of Germany*. Community Dent Oral Epidemiol, 1993. **21**(6): p. 379-83.
7. Fure, S. and I. Zickert, *Incidence of tooth loss and dental caries in 60-, 70- and 80-year-old Swedish individuals*. Community Dent Oral Epidemiol, 1997. **25**(2): p. 137-42.
8. Schatzle, M., et al., *The clinical course of chronic periodontitis*. J Clin Periodontol, 2004. **31**(12): p. 1122-7.
9. Weber, T., *Zahnmedizin*. 3rd ed. Memorix. 2010, Stuttgart: Thieme.
10. Hellwig, E., J. Klimek, and T. Attin, *Einführung in die Zahnerhaltung: Prüfungswissen Kariologie, Endodontologie und Parodontologie*. 6th ed. 2013, Köln: Deutscher Zahnärzte Verlag.
11. Müller, H.P., *Parodontologie*. 2nd ed. Checklisten der Zahnmedizin. 2006, Stuttgart: Thieme.
12. Candel-Marti, M.E., et al., *Interleukins IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 and periimplant disease. An update*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2011. **16**(4): p. e518-21.
13. Plewig, G., et al., *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie - Band 2*. 7. ed. 2018: Springer.
14. Huber, B., *[100 years of allergy: Clemens von Pirquet--his concept of allergy and his basic understanding of the disease: 2: The Pirquet concept of allergy]*. Wien Klin Wochenschr, 2006. **118**(23-24): p. 718-27.
15. Janeway, C.A., et al., *Immunologie*. 5th ed. 2002, Heidelberg: Spektrum.
16. *Contact Dermatitis*. 5th ed. Contact Dermatitis, ed. J.D. Johansen, Frosch, Peter, J., Lepoittevin, Jean-Pierre (Eds.). 2011: Springer.
17. Hallab, N.J. and J.J. Jacobs, *Biologic effects of implant debris*. Bull NYU Hosp Jt Dis, 2009. **67**(2): p. 182-8.
18. Guenther, D., et al., *Allergic reactions in arthroplasty: myth or serious problem?* International Orthopaedics, 2015. **40**: p. 239-244.
19. F. Javed, K.A.-H., K. Almas, and G. E. Romanos, *Is titanium sensitivity associated with allergic reactions in patients with dental implants? A systematic review*. Clinical Implant Dentistry and Related Research, 2013. **15**.
20. Hallab, N., K. Merritt, and J.J. Jacobs, *Metal sensitivity in patients with orthopaedic implants*. J Bone Joint Surg Am, 2001. **83-A**(3): p. 428-36.

21. Hofmann, S., et al., *Titanium hypersensitivity causing painful intra-abdominal oedema after staple-fixed inguinal hernia repair*. Contact Dermatitis, 2018. **79**(1).
22. Lalor, P.A., et al., *Sensitivity to titanium. A cause of implant failure?* J Bone Joint Surg Br, 1991. **73**(1): p. 25-8.
23. Siddiqi Allauddin , A.G.T.P., Rohana Kumara De Silva, Warwick J. Duncan, *Titanium allergy: could it affect dental implant integration?* Clinical Oral Implants Research, 2011. **22**(7).
24. Laquerriere, P., et al., *Importance of hydroxyapatite particles characteristics on cytokines production by human monocytes in vitro*. Biomaterials, 2003. **24**(16): p. 2739-47.
25. Sieving, A., et al., *Morphological characteristics of total joint arthroplasty-derived ultra-high molecular weight polyethylene (UHMWPE) wear debris that provoke inflammation in a murine model of inflammation*. J Biomed Mater Res A, 2003. **64**(3): p. 457-64.
26. Beck, T.J., et al., *Surface structure of TiO₂(011)-(2x1)*. Phys Rev Lett, 2004. **93**(3): p. 036104.
27. Diebold, U., *The surface science of titanium dioxide*. 2003. **48**: p. 53-229.
28. Li, S.C. and U. Diebold, *Reactivity of TiO₂ rutile and anatase surfaces toward nitroaromatics*. J Am Chem Soc, 2010. **132**(1): p. 64-6.
29. Luttmann, W., et al., *Immunologie*. 3rd ed. Der Experimentator. 2009, Heidelberg: Spektrum.
30. Maness, P.C., et al., *Bactericidal activity of photocatalytic TiO₂ reaction: toward an understanding of its killing mechanism*. Appl Environ Microbiol, 1999. **65**(9): p. 4094-8.
31. Baan, R., et al., *Carcinogenicity of carbon black, titanium dioxide, and talc*. Lancet Oncol, 2006. **7**(4): p. 295-6.
32. Kirschvink, J.L., M.M. Walker, and C.E. Diebel, *Magnetite-based magnetoreception*. Curr Opin Neurobiol, 2001. **11**(4): p. 462-7.
33. Kirschvink, J.L., A. Kobayashi-Kirschvink, and B.J. Woodford, *Magnetite biomineralization in the human brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(16): p. 7683-7.
34. Donlin, M., et al., *Analysis of iron in ferritin, the iron-storage protein*. J Chem Educ, 1998. **75**: p. 437-441.
35. Oberdorster, G., E. Oberdorster, and J. Oberdorster, *Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles*. Environ Health Perspect, 2005. **113**(7): p. 823-39.
36. Chen, J.L. and W.E. Fayerweather, *Epidemiologic study of workers exposed to titanium dioxide*. J Occup Med, 1988. **30**(12): p. 937-42.
37. Zhang, L., et al., *Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments*. Clin Pharmacol Ther, 2008. **83**(5): p. 761-9.
38. Akerman, M.E., et al., *Nanocrystal targeting in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(20): p. 12617-21.
39. Chen, T., J. Yan, and Y. Li, *Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles*. J Food Drug Anal, 2014. **22**(1): p. 95-104.
40. Toyooka, T., T. Amano, and Y. Ibuki, *Titanium dioxide particles phosphorylate histone H2AX independent of ROS production*. Mutat Res, 2012. **742**(1-2): p. 84-91.

41. Garcia-Contreras, R., et al., *Alteration of metabolomic profiles by titanium dioxide nanoparticles in human gingivitis model*. Biomaterials, 2015. **57**: p. 33-40.
42. Oberdorster, G., J. Ferin, and B.E. Lehnert, *Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury*. Environ Health Perspect, 1994. **102 Suppl 5**: p. 173-9.
43. Esposito, M., et al., *Surface analysis of failed oral titanium implants*. J Biomed Mater Res, 1999. **48**(4): p. 559-68.
44. Lausmaa, J., B. Kasemo, and H. Mattsson, *Surface spectroscopic characterization of clinical titanium implant materials*. Appl Surf Sci, 1990. **44**: p. 133-146.
45. Keller, J.C., et al., *Characterization of sterilized CP titanium implant surfaces*. Int J Oral Maxillofac Implants, 1990. **5**(4): p. 360-7.
46. Arys, A., et al., *Analysis of titanium dental implants after failure of osseointegration: combined histological, electron microscopy, and X-ray photoelectron spectroscopy approach*. J Biomed Mater Res, 1998. **43**(3): p. 300-12.
47. Lang, N.P., et al., *Effect of interleukin-1 gene polymorphisms on gingival inflammation assessed by bleeding on probing in a periodontal maintenance population*. J Periodontal Res, 2000. **35**(2): p. 102-7.
48. Dinarello, C.A., *Biologic basics for interleukin-1 in disease*. Blood, 1996. **87**: p. 2095-147.
49. Singh, P.K., et al., *Production of beta-defensins by human airway epithelia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**: p. 14961-6.
50. Terui, T., et al., *An increased ratio of interleukin-1 receptor antagonist to interleukin-1 alpha in inflammatory skin diseases*. Exp Dermatol, 1998. **7**: p. 327-34.
51. Horai, R., et al., *Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1alpha, IL-1beta, IL-1alpha/beta, and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1beta is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion*. J Exp Med, 1998. **187**: p. 1463-75.
52. Mosley, B., et al., *The Interleukin-1 receptor binds the human interleukin-1 alpha precursor but not the interleukin-1 beta precursor*. J Biol Chem, 1987. **262**: p. 2941-4.
53. Hamdy, A.A. and M.A. Ebrahim, *The effect of interleukin-1 allele 2 genotype (IL-1a(-889) and IL-1b(+3954)) on the individual's susceptibility to peri-implantitis: case-control study*. J Oral Implantol, 2011. **37**(3): p. 325-34.
54. Coelho, A.L., C.M. Hogaboam, and S.L. Kunkel, *Chemokines provide the sustained inflammatory bridge between innate and acquired immunity*. Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**: p. 553-60.
55. Holmes, W.E., et al., *Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor*. Science, 1991. **253**: p. 1278-80.
56. Burke, S.M., et al., *Human mast cell activation with virus-associated stimuli leads to the selective chemotaxis of natural killer cells by a CXCL8-dependent mechanism*. Blood, 2008. **111**(12): p. 5467-76.
57. Akdis, M., et al., *Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(3): p. 701-21 e1-70.
58. Honda, M., et al., *Human soluble IL-6 receptor; its detection and enhanced release by HIV infection*. J Immunol, 1992. **148**: p. 2175-80.

59. Hurst, S.M., et al., *IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation*. Immunity, 2001. **14**(705-14).
60. Hirano, T., et al., *Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**: p. 5490-4.
61. Dominici, R., et al., *Cloning and functional analysis of the allelic polymorphism in the transcription regulatory region of interleukin-1 alpha*. Immunogenetics, 2002. **54**(2): p. 82-6.
62. Andus, T., et al., *Imbalance of the interleukin 1 system in colonic mucosa--association with intestinal inflammation and interleukin 1 receptor antagonist [corrected] genotype 2*. Gut, 1997. **41**(5): p. 651-7.
63. Wilson, A.G., et al., *Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(7): p. 3195-9.
64. Kornman, K.S., et al., *The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease*. J Clin Periodontol, 1997. **24**(1): p. 72-7.
65. Pociot, F., et al., *A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro*. Eur J Clin Invest, 1992. **22**(6): p. 396-402.
66. Cork, M., et al., *Novel genetic association of an IL-1-beta gene variation at +3953, susceptibility to psoriasis and IL-1-beta protein-production*. J Invest Dermatol, 1995. **105**.
67. Engebretson, S.P., et al., *The influence of interleukin gene polymorphism on expression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in periodontal tissue and gingival crevicular fluid*. J Periodontol, 1999. **70**(6): p. 567-73.
68. Figueredo, C.M., et al., *Increased interleukin-1beta concentration in gingival crevicular fluid as a characteristic of periodontitis*. J Periodontol, 1999. **70**(12): p. 1457-63.
69. Meisel, P., et al., *Smoking and polymorphisms of the interleukin-1 gene cluster (IL-1alpha, IL-1beta, and IL-1RN) in patients with periodontal disease*. J Periodontol, 2002. **73**(1): p. 27-32.
70. Moreira, P.R., et al., *A functional interleukin-1 beta gene polymorphism is associated with chronic periodontitis in a sample of Brazilian individuals*. J Periodontal Res, 2005. **40**(4): p. 306-11.
71. De Sanctis, M. and G. Zucchelli, *Interleukin-1 gene polymorphisms and long-term stability following guided tissue regeneration therapy*. J Periodontol, 2000. **71**(4): p. 606-13.
72. Christgau, M., et al., *Influence of interleukin-1 gene polymorphism on periodontal regeneration in intrabony defects*. J Periodontal Res, 2003. **38**(1): p. 20-7.
73. Weiss, O.I., et al., *Effect of the interleukin-1 genotype on outcomes of regenerative periodontal therapy with bone replacement grafts*. J Periodontol, 2004. **75**(10): p. 1335-42.
74. Nieri, M., et al., *The prognostic value of several periodontal factors measured as radiographic bone level variation: a 10-year retrospective multilevel analysis of treated and maintained periodontal patients*. J Periodontol, 2002. **73**(12): p. 1485-93.
75. Campos, M.I., et al., *Early failure of dental implants and TNF-alpha (G-308A) gene polymorphism*. Implant Dent, 2004. **13**(1): p. 95-101.

76. Campos, M.I., et al., *Evaluation of the relationship between interleukin-1 gene cluster polymorphisms and early implant failure in non-smoking patients*. Clin Oral Implants Res, 2005. **16**(2): p. 194-201.
77. Laine, M.L., et al., *IL-1RN gene polymorphism is associated with peri-implantitis*. Clin Oral Implants Res, 2006. **17**(4): p. 380-5.
78. Montes, C.C., et al., *Analysis of the association of IL1B (C+3954T) and IL1RN (intron 2) polymorphisms with dental implant loss in a Brazilian population*. Clin Oral Implants Res, 2009. **20**(2): p. 208-17.
79. Shimpuku, H., et al., *Genetic polymorphisms of the interleukin-1 gene and early marginal bone loss around endosseous dental implants*. Clin Oral Implants Res, 2003. **14**(4): p. 423-9.
80. Lin, Y.H., et al., *The relationship between IL-1 gene polymorphism and marginal bone loss around dental implants*. J Oral Maxillofac Surg, 2007. **65**(11): p. 2340-4.
81. Ehmke, B., et al., *Interleukin-1 haplotype and periodontal disease progression following therapy*. J Clin Periodontol, 1999. **26**(12): p. 810-3.
82. König, J., et al., *Influence of interleukin (IL)-1 composite genotype on clinical variables in non-smoking, well-maintained compliant patients with chronic periodontitis*. Swed Dent J, 2005. **29**(1): p. 11-6.
83. Cullinan, M.P., et al., *A longitudinal study of interleukin-1 gene polymorphisms and periodontal disease in a general adult population*. J Clin Periodontol, 2001. **28**(12): p. 1137-44.
84. Liao, J., et al., *Meta-analysis of the association between common interleukin-1 polymorphisms and dental implant failure*. Mol Biol Rep, 2014. **41**(5): p. 2789-98.
85. Jansson, H., et al., *Clinical consequences of IL-1 genotype on early implant failures in patients under periodontal maintenance*. Clin Implant Dent Relat Res, 2005. **7**(1): p. 51-9.
86. McGuire, M.K. and M.E. Nunn, *Prognosis versus actual outcome. IV. The effectiveness of clinical parameters and IL-1 genotype in accurately predicting prognoses and tooth survival*. J Periodontol, 1999. **70**(1): p. 49-56.
87. Garcia-Delaney, C., et al., *Clinical significance of interleukin-1 genotype in smoking patients as a predictor of peri-implantitis: A case-control study*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2015. **20**(6): p. e737-43.
88. Lachmann, S., et al., *Associations between peri-implant crevicular fluid volume, concentrations of crevicular inflammatory mediators, and composite IL-1A -889 and IL-1B +3954 genotype. A cross-sectional study on implant recall patients with and without clinical signs of peri-implantitis*. Clin Oral Implants Res, 2007. **18**(2): p. 212-23.
89. Hultin, M., et al., *Microbiological findings and host response in patients with peri-implantitis*. Clin Oral Implants Res, 2002. **13**(4): p. 349-58.
90. Ataoglu, H., et al., *Interleukin-1beta, tumor necrosis factor-alpha levels and neutrophil elastase activity in peri-implant crevicular fluid*. Clin Oral Implants Res, 2002. **13**(5): p. 470-6.
91. Murata, M., et al., *Osteocalcin, deoxypyridinoline and interleukin-1beta in peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implantitis*. Clin Oral Implants Res, 2002. **13**(6): p. 637-43.
92. Offenbacher, S., *Periodontal diseases: pathogenesis*. Ann Periodontol, 1996. **1**(1): p. 821-78.

93. Gemmell, E., R.I. Marshall, and G.J. Seymour, *Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease*. Periodontol 2000, 1997. **14**: p. 112-43.
94. Kornman, K.S., R.C. Page, and M.S. Tonetti, *The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players*. Periodontol 2000, 1997. **14**: p. 33-53.
95. Gruica, B., et al., *Impact of IL-1 genotype and smoking status on the prognosis of osseointegrated implants*. Clin Oral Implants Res, 2004. **15**(4): p. 393-400.
96. Rakic, M., et al., *Estimation of bone loss biomarkers as a diagnostic tool for peri-implantitis*. J Periodontol, 2014. **85**(11): p. 1566-74.
97. Lindhe, J., J. Meyle, and G. DoEWoP, *Peri-implant diseases: consensus report of the sixth European workshop on periodontology*. J Clin Periodontol, 2008. **35**(s8).
98. Abrahamsson, I., T. Berglundh, and J. Lindhe, *Soft tissue response to plaque formation at different implant systems. A comparative study in the dog*. Clin Oral Implants Res, 1998. **9**(2).
99. Mombelli, A., et al., *The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants*. Oral Microbiol Immunol, 1987. **2**(4).
100. Ong, E.S., et al., *The occurrence of periodontitis-related microorganisms in relation to titanium implants*. J Periodontol, 1992. **63**(3).
101. Kolenbrander, P.E., *Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems*. Annu Rev Microbiol, 2000. **54**.
102. Koyanagi, T., et al., *Analysis of microbiota associated with peri-implantitis using 16S rRNA gene clone library*. J Oral Microbiol, 2010. **24**(2).
103. Mombelli, A. and F. Decaillet, *The characteristics of biofilms in peri-implant disease*. J Clin Periodontol, 2011. **38**(s11).
104. Mombelli, A., F. Casagni, and P.N. Madianos, *Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systemic review*. Journal of Clinical Periodontology, 2002. **29**(s3).
105. Gouvoussis, J., D. Sindhusake, and S. Yeung, *Cross-infection from periodontitis sites to failing implant sites in the same mouth*. Int J Oral Maxillofac Implants, 1997. **12**(5).
106. Quirynen, M., et al., *Dynamics of initial subgingival colonization of 'pristine' peri-implant pockets*. Clin Oral Implants Res, 2006. **17**(1).
107. Danser, M.M., et al., *Short-term effect of full-mouth extraction on periodontal pathogens colonizing the oral mucous membranes*. J Clin Periodontol, 1994. **21**(7).
108. Offenbacher, S., et al., *Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight*. J Periodontol, 1996. **67**(10 Suppl): p. 1103-13.
109. Zambon, J.J., *Periodontal diseases: microbial factors*. Ann Periodontol, 1996. **1**(1): p. 879-925.
110. van Winkelhoff, A.J., et al., *Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction*. J Clin Periodontol, 2002. **29**(11): p. 1023-8.
111. Bieri, R.A., et al., *Gingival fluid cytokine expression and subgingival bacterial counts during pregnancy and postpartum: a case series*. Clin Oral Investig, 2013. **17**(1): p. 19-28.

112. Gomes, S.C., et al., *Periodontal status in smokers and never-smokers: clinical findings and real-time polymerase chain reaction quantification of putative periodontal pathogens*. J Periodontol, 2006. **77**(9): p. 1483-90.
113. Christensen, G.D., et al., *Microbial and foreign body factors in the pathogenesis of medical device infections*. Infections Associated with Indwelling Medical Devices, 1989.
114. Fürst, M.M., et al., *Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants*. Clinical and Oral Implants Research, 2007. **18**.
115. Salvi, G.E., et al., *One-year bacterial colonization patterns of Staphylococcus aureus and other bacteria at implants and adjacent teeth*. Clinical and Oral Implants Research, 2008. **19**.
116. Heuer, W., et al., *Metagenomic analysis of the peri-implant and periodontal microflora in patients with clinical signs of gingivitis or mucositis*. Clin Oral Investig, 2012. **16**(3).
117. Keller, W., U. Bragger, and A. Mombelli, *Peri-implant microflora of implants with cemented and screw retained suprastructures*. Clin Oral Implants Res, 1998. **9**(4).
118. Burgers, R., et al., *In vivo and in vitro biofilm formation on two different titanium implant surfaces*. Clin Oral Implants Res, 2010. **21**(2): p. 156-64.
119. Elter, C., et al., *Supra- and subgingival biofilm formation on implant abutments with different surface characteristics*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2008. **23**(2).
120. Schwarz, F., et al., *Real-time PCR analysis of fungal organisms and bacterial species at peri-implantitis sites*. Int J Implant Dent., 2015.
121. Heimdahl, A., et al., *Effect of insertion of osseointegrated prosthesis on the oral microflora*. Swedish Dental Journal, 1983. **7**: p. 199-204.
122. Adell, R., et al., *Marginal tissue reactions at osseointegrated titanium fixtures*. International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 1986. **15**: p. 39-52.
123. Krekeler, G., K. Pelz, and R. Nelissen, *Mikrobielle Besiedlung der Zahnfleischtaschen am künstlichen Titanpfeiler*. Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift, 1986. **41**: p. 569-572.
124. Mombelli, A., D. Buser, and N.P. Lang, *Colonization of osseointegrated titanium implants in edentulous patients. Early results*. Oral Microbiology and Immunology, 1988. **3**: p. 113-120.
125. Sanz, M., et al., *Characterization of the subgingival microbial flora around endosteal sapphire dental implants in partially edentulous patients*. International Journal of Oral and Maxillofacial Implants, 1990. **5**: p. 247-253.
126. Becker, W., et al., *Clinical and microbiologic findings that may contribute to dental implant failure*. International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 1990. **5**: p. 31-38.
127. Rosenberg, E.S., J.P. Torosian, and J. Slots, *Microbial differences in 2 clinically distinct types of failures of osseointegrated implants*. Clinical and Oral Implants Research, 1991. **2**: p. 135-144.
128. Alcoforado, G.A.P., et al., *Aspects bactériologiques des échecs des implants dentaires ostéointégrés chez l'homme*. Parodontologie, 1991. **10**: p. 11-18.
129. Kalykakis, G., et al., *Clinical and microbiological status of osseointegrated implants*. Journal of Periodontology, 1994. **65**: p. 766-770.
130. Salcetti, J.M., et al., *The clinical, microbial, and host response characteristics of the failing implant*. International Journal of Oral and Maxillofacial Implants, 1997. **12**: p. 32-42.

131. Danser, M.M., A.J. van Winkelhoff, and U. van der Velden, *Periodontal bacteria colonizing oral mucous membranes in edentulous patients wearing dental implants*. Journal of Periodontology, 1997. **68**: p. 209-216.
132. Mombelli, A., et al., *Treatment of peri-implantitis by local delivery of tetracycline. Clinical, microbiological and radiological results*. Clinical and Oral Implants Research, 2001. **12**: p. 287-294.
133. Rutar, A., et al., *Retrospective assessment of clinical and microbiological factors affecting peri-implant tissue conditions*. Clinical and Oral Implants Research, 2001. **12**: p. 189-195.
134. Leonhardt, A., G. Dahlen, and S. Renvert, *Five-year clinical, microbiological, and radiological outcome following treatment of peri-implantitis in man*. Journal of Periodontology, 2003. **74**: p. 1415-1422.
135. Botero, J.E., et al., *Subgingival microbiota in peri-implant mucosa lesions and adjacent teeth in partially edentulous patients*. Journal of Periodontology, 2005. **76**: p. 1490-1495.
136. Persson, G.R., et al., *Antimicrobial therapy using a local drug delivery system (Arestin) in the treatment of peri-implantitis. I: microbiological outcomes*. Clinical and Oral Implants Research, 2006. **17**: p. 386-393.
137. Persson, G.R., et al., *Mechanical non-surgical treatment of peri-implantitis: a single-blinded randomized longitudinal clinical study. II. Microbiological results*. Journal of Clinical Periodontology, 2010. **37**: p. 563-573.
138. Shibli, J.A., et al., *Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants*. Clin Oral Implants Res, 2008. **19**(10).
139. Maximo, M.B., et al., *Short-term clinical and microbiological evaluations of peri-implant diseases before and after mechanical anti-infective therapies*. Clinical and Oral Implants Research, 2009. **20**: p. 99-108.
140. Tabanella, G., H. Nowzari, and J. Slots, *Clinical and microbiological determinants of ailing dental implants*. Clinical Implant Dentistry and Related Research, 2009. **11**: p. 24-36.
141. Teles, R.P., et al., *Salivary cytokine levels in subjects with chronic periodontitis and in periodontally healthy individuals: a cross-sectional study*. J Periodontal Res, 2009. **44**(3): p. 411-7.
142. Ishihara, Y., et al., *Gingival crevicular interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist levels in periodontally healthy and diseased sites*. J Periodontal Res, 1997. **32**(6): p. 524-9.
143. Kurtis, B., et al., *IL-6 levels in gingival crevicular fluid (GCF) from patients with non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM), adult periodontitis and healthy subjects*. J Oral Sci, 1999. **41**(4): p. 163-7.
144. Offenbacher, S., et al., *Periodontal disease at the biofilm-gingival interface*. J Periodontol, 2007. **78**(10): p. 1911-25.
145. Reinhardt, R.A., et al., *Gingival fluid IL-1 and IL-6 levels in refractory periodontitis*. J Clin Periodontol, 1993. **20**(3): p. 225-31.
146. Miller, C.S., et al., *Salivary biomarkers of existing periodontal disease: a cross-sectional study*. J Am Dent Assoc, 2006. **137**(3): p. 322-9.
147. Ng, P.Y., et al., *Candidate salivary biomarkers associated with alveolar bone loss: cross-sectional and in vitro studies*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2007. **49**(2): p. 252-60.
148. Ramseier, C.A., et al., *Identification of pathogen and host-response markers correlated with periodontal disease*. J Periodontol, 2009. **80**(3): p. 436-46.

149. Gamonal, J., et al., *Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment*. J Periodontol, 2000. **71**(10): p. 1535-45.
150. Holmlund, A., L. Hanstrom, and U.H. Lerner, *Bone resorbing activity and cytokine levels in gingival crevicular fluid before and after treatment of periodontal disease*. J Clin Periodontol, 2004. **31**(6): p. 475-82.
151. Hou, L.T., C.M. Liu, and E.F. Rossomando, *Crevicular interleukin-1 beta in moderate and severe periodontitis patients and the effect of phase I periodontal treatment*. J Clin Periodontol, 1995. **22**(2): p. 162-7.
152. Ruhl, S., et al., *Salivary proteins and cytokines in drug-induced gingival overgrowth*. J Dent Res, 2004. **83**(4): p. 322-6.
153. Wozniak, K.L., et al., *Inhibitory effects of whole and parotid saliva on immunomodulators*. Oral Microbiol Immunol, 2002. **17**(2): p. 100-7.
154. Rakic, M., M.G. Grusovin, and L. Canullo, *The Microbiologic Profile Associated with Peri-Implantitis in Humans: A Systematic Review*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2016. **31**(2): p. 359-68.
155. Canullo, L., et al., *The predictive value of microbiological findings on teeth, internal and external implant portions in clinical decision making*. Clin Oral Implants Res, 2016.
156. Thomas, P., et al., *Allergy or tolerance: reduced inflammatory cytokine response and concomitant IL-10 production of lymphocytes and monocytes in symptom-free titanium dental implant patients*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 539834.

12Danksagung

Mein Dank gilt denjenigen Personen, die mich während der Bearbeitung meiner Dissertation unterstützt haben.

Ein herzliches Dankeschön gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Peter Thomas für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas und dafür, dass ich die Möglichkeit bekommen habe, hierbei mitwirken zu können. Ich möchte mich auch für die tolle fortlaufende Unterstützung und die lieben Worte während der gesamten Bearbeitungszeit bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Burkhard Summer für seine Betreuung, seine Hilfsbereitschaft und dafür, mir stets bei allen aufkommenden Fragen zur Verfügung gestanden zu haben. Seine Ratschläge und seine Unterstützung habe ich sehr geschätzt.

Dr. Gerhard Iglhaut danke ich besonders für seine Unterstützung in dieser Arbeit und dafür, dass durch sein großes Interesse am Thema, diese Studie überhaupt ermöglicht wurde.

Danken möchte ich außerdem noch Herrn Ralph Pohl, der im Labor stets präsent war und mir mit Rat und Tat zur Seite stand. Genauso möchte ich Herrn Anton Mundig danken, der mich bei der Bewältigung und Auswertung der Daten unterstützt hat.

Meinen Eltern gilt ein besonderer Dank, für die große und liebevolle Unterstützung während meiner gesamten Studien- und Doktorarbeitszeit. Ebenso wie meinen Mitstudenten und Freunden, die mich im Rahmen des Studiums begleitet und moralisch unterstützt haben.

13 Eidesstattliche Versicherung

Pauly Aurélie

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Verträglichkeitsaspekte von Titanzahnimplantaten

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Luxemburg, den 17.04.2019

Ort, Datum

Aurélie Pauly

Unterschrift Doktorandin/Doktorand